



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José do Rio Preto

Gabriela Okamura da Silva

Produção e caracterização de pectinases pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC e avaliação do efeito de sua aplicação em coquetel enzimático na sacarificação da palha da cana-de-açúcar

São José do Rio Preto

2019

Gabriela Okamura da Silva

Produção e caracterização de pectinases pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC e avaliação do efeito de sua aplicação em coquetel enzimático na sacarificação da palha da cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto

2019

S586p Silva, Gabriela Okamura  
Produção e caracterização de pectinases pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC e avaliação do efeito de sua aplicação em coquetel enzimático na sacarificação da palha da cana-de-açúcar / Gabriela Okamura Silva. -- São José do Rio Preto, 2019  
79 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto  
Orientadora: Eleni Gomes

1. Microbiologia. 2. Fungos termofílicos. 3. Enzimas de fungos.  
4. Lignocelulose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Gabriela Okamura da Silva

Produção e caracterização de pectinases pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC e avaliação do efeito de sua aplicação em coquetel enzimático na sacarificação da palha da cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Eleni Gomes  
UNESP – São José do Rio Preto/SP  
Orientadora

Profa. Dra. Márcia Luzia Rizzatto  
IFSP – Matão/SP

Profa. Dra. Tatiane Iembo  
FACERES – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto  
25 de abril de 2019

Aos meus pais, Antônio Aparecido da Silva e Tereza Cristina  
Okamura.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Eleni Gomes pela orientação durante esses 4 anos e por ser um exemplo a todos nós do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

Aos meus pais, tios e avós por toda dedicação, carinho e por tudo que me ensinaram.

Ao meu irmão Matheus e meus primos Antônio Henrique, Beatriz, Bruna, Daniel, José Vinícius, Liliane, Marcus, Nathália Pedro, Samantha e, em especial, à minha prima, parceira e melhor amiga Milena, por todo o companheirismo, amizade e apoio durante esses anos.

Aos meus queridos amigos Aruan, Fernando Buzinari, Fernando Cornacini, Gabriela, Gideão, João Gabriel, Lara, Lucas e Michelle.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Marcel, o qual só tenho a agradecer pela paciência, pelo carinho e, principalmente, pelo apoio.

Aos amigos do LBMA por todos os momentos compartilhados. Em especial os queridos Ana Lúcia, Carolina, Carlos Eduardo, Cíntia, Diego, Eduardo Duffeck, Eduardo Simioni, Erick, Isabel, Janaína, Jaqueline, Josiani, Lorena, Maitê, Pâmela, Pedro Lucas, Roni e Thiago.

À Unesp e a todos os seus funcionários, em especial aos docentes e funcionários da Seção de Pós-Graduação, que permitiram que o sonho se tornasse realidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Os resíduos agroindustriais compostos por, em sua maior parte, lignocelulose, podem ser desestruturados em monômeros de açúcares e derivados fenólicos que, por sua vez, podem ser convertidos em bioprodutos com valor agregado como etanol de segunda geração, ácidos orgânicos, aditivos para alimentos, entre outros. O processo de desestruturação da lignocelulose envolve, geralmente, um tratamento químico e/ou físico, seguido de sacarificação enzimática, que requer um coquetel multi-enzimático composto por celulases, hemicelulases, ligninases e enzimas acessórias, como as oxidases e pectinases. Estas últimas, além de aumentar a eficiência das primeiras, com consequente aumento no rendimento, aumentam também a velocidade do processo, devido à degradação da pectina da parede celular vegetal. Considerando que o grupo de pesquisa ao qual esse trabalho está vinculado tem desenvolvido pesquisas com as ligninases, celulases, hemicelulases e pectinases, este estudo teve por objetivo a produção, caracterização físico-química e a purificação parcial de pectinases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC, e a avaliação do efeito dessas enzimas quando adicionadas ao coquetel enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4, composto por celulases e hemicelulases, sobre a hidrólise da palha de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que, utilizando-se a mistura de bagaço de laranja e de cana-de-açúcar como substrato para cultivo em estado sólido para produção das enzimas, obteve-se 471,05 U g<sup>-1</sup> de atividade de pectinase, que mostrou ser uma poligalacturonase termofílica, com maior atividade em pH 4,5 e a 65-70°C. A solução dessa enzima foi adicionada ao coquetel enzimático obtido pelo cultivo de *M. thermophila*, o qual foi usado para hidrolisar palha de cana-de-açúcar submetida a pré-tratamento hidrotérmico alcalino. Os resultados indicaram um rendimento de 11% em glicose liberada na etapa de sacarificação enzimática da palha pré-tratada, com total de 73,15 mg g<sup>-1</sup> palha.

**Palavras-chave:** fungo termofílico; enzimas; resíduos lignocelulósicos; sacarificação.

## ABSTRACT

*Agroindustrial wastes whose composition mainly lignocellulose can be deconstructed into sugar monomers and phenolic derivatives, which can be converted into added value bioproducts such as second generation ethanol, organic acids, additives for food and others. The process of destruction of lignocellulose usually involves a chemical and/or physical treatment, followed by enzymatic saccharification. This process requires a multi-enzymatic cocktail composed of cellulases, hemicellulases, ligninases and accessory enzymes, such as oxidases and pectinases. The addition of the pectinases increases the efficiency of the saccharification, resulting in the higher yield and speed of the process, due to the degradation of pectin from the plant cell wall. Considering that the research group to which this work is linked, has developed researches with ligninases, cellulases, hemicelluloses and pectinase, this study had the objective of the production, physicochemical characterization and partial purification of pectinases produced by the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* BC and the evaluation of the effect of the addition of this enzyme to the enzymatic cocktail produced by the fungus *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 containing cellulases and hemicellulases, on the hydrolysis of sugarcane straw. The results showed that, using a mixture of orange and sugarcane bagasses as a substrate for fungus cultivation by solid-state fermentation, 471.05 U g<sup>-1</sup> of pectinase activity (evaluated as polygalacturonase) was obtained, with a higher activity at pH 4.5 and 65°C. Solution of this enzyme was added to the enzymatic cocktail obtained from *M. thermophila* which was used to hydrolyze sugarcane straw pre-treated with alkaline hydrothermal and resulted in a sugar yield of 11% in the enzymatic saccharification step, with obtainment of 73.15 mg g<sup>-1</sup> of pre-treated straw.*

**Key-words:** *thermophilic fungus; enzymes; lignocellulosic waste; saccharification.*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Origem e organização da lignocelulose.....	16
<b>Figura 2.</b> Estrutura da molécula de celulose.....	17
<b>Figura 3.</b> Estrutura da hemicelulose. ....	18
<b>Figura 4.</b> Unidades de (a) p-hidroxifenila, (b) guaiacila e (c) siringila, formadoras da estrutura da lignina.....	19
<b>Figura 5.</b> Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter $\beta$ -O-4. ....	20
<b>Figura 6.</b> Ação catalítica do complexo celulolítico. ....	22
<b>Figura 7.</b> Ação de diversas enzimas na estrutura da arabinoxilana. ....	23
<b>Figura 8.</b> Sequência principal da pectina.....	24
<b>Figura 9.</b> Diagrama da parede celular vegetal.....	24
<b>Figura 10.</b> Estrutura da pectina. Representação esquemática da convencional (A) e da alternativa recentemente proposta (B). ....	26
<b>Figura 11.</b> Componentes da molécula de pectina, com associação de açúcares e atuação das pectinases.....	29
<b>Figura 12.</b> Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina decorrentes de técnicas de pré-tratamento.....	34
<b>Figura 13.</b> Atividade de pectinases ( $U\ g^{-1}$ ) na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em estado sólido (CES) em diferentes substratos.....	47
<b>Figura 14.</b> Efeito do pH sobre a atividade de pectinases ( $U\ g^{-1}$ ) da solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em CES. .	49
<b>Figura 15.</b> Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinases ( $U\ g^{-1}$ ) da solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em CES. .	51
<b>Figura 16.</b> Efeito do pH sobre a estabilidade (%) de pectinases produzidas pelo fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em CES. A solução enzimática foi incubada nos diferentes pHs, em ausência de substrato, a 25 °C, por 24 horas. ....	52

<b>Figura 17.</b> Efeito da temperatura sobre a estabilidade (%) de pectinases produzidas pelo fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em CES. A solução enzimática foi incubada em diversas temperaturas e em ausência de substrato por 1 hora. ....	53
<b>Figura 18.</b> Atividade da solução enzimática bruta ( $U\ g^{-1}$ ) produzida pelo fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC em CES, sobre substâncias pécticas com diferentes níveis de esterificação. ....	54
<b>Figura 19.</b> (A) SDS-PAGE da solução enzimática bruta; (B) Zimograma de atividade de poligalacturonase (PG); (C) SDS-PAGE da PG parcialmente purificada. M: marcador. ....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das pectinases com base no modo de ação. ....	29
<b>Tabela 2.</b> Atividade enzimática de pectinases, xilanases, endoglucanases (CMCases) e $\beta$ -glicosidases ( $U\ g^{-1}$ ) produzidas pelo fungo <i>Rasamsonia emersonii</i> BC, quando comparado as soluções enzimáticas bruta e parcialmente purificada. ...	56
<b>Tabela 3.</b> Atividade de xilanases, endoglucanases (CMCases), pectinases, FPases, $\beta$ -glicosidases e $\beta$ -xilosidases produzidas pelo fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> JCP 1-4, em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p), a 45°C, em 96 horas. ....	57
<b>Tabela 4.</b> Análise de composição química (%) para amostras de palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e tratadas com pré-tratamento hidrotérmico alcalino. ....	59
<b>Tabela 5.</b> Liberação de glicose durante a sacarificação enzimática da palha da cana-de-açúcar <i>in natura</i> e após tratamento hidrotérmico alcalino. Foram utilizadas as soluções produzidas pelos fungos <i>Myceliophthora thermophila</i> JCP 1-4 e <i>Rasamsonia emersonii</i> BC isoladamente, assim como nas proporções de 1:1 e 3:1, respectivamente. PC = palha de cana-de-açúcar. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>CAPS</b>	3-(Ciclohexilamino)-1-ácido propanosulfônico
<b>CES</b>	Cultivo em estado sólido
<b>CMC</b>	Carboximetilcelulose
<b>CFT</b>	Compostos fenólicos totais
<b>CMCase</b>	Carboximetilcelulase
<b>DNS</b>	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
<b>HG</b>	Homogalacturonana
<b>HEPES</b>	Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>PG</b>	Poligalacturonase
<b>PE</b>	Pectinesterase
<b>PL</b>	Pectinaliase
<b>pNPG</b>	<i>p-nitro</i> -fenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo
<b>pNPX</b>	<i>p-nitro</i> -fenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo
<b>RG</b>	Ramnogalacturonana
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio

**SDS-PAGE**

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida com SDS

**TRIS**

Tris (hidroximetil) aminometano

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1 Lignocelulose</b> .....	16
2.1.1 Celulose .....	17
2.1.2 Hemicelulose .....	18
2.1.3 Lignina .....	19
<b>2.2 Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico</b> .....	20
2.2.1 Celulases .....	21
2.2.2 Hemicelulases .....	22
<b>2.3 Substâncias pécticas</b> .....	23
<b>2.4 Enzimas pectinolíticas</b> .....	26
<b>2.5 Aplicações das enzimas pectinolíticas</b> .....	30
<b>2.6 Pectinases fúngicas e termoestáveis</b> .....	31
<b>2.7 Sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica</b> .....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 Objetivo geral .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
<b>4.1 Cultivo em estado sólido</b> .....	37
4.1.1 Microrganismos utilizados .....	37
4.1.2 Substratos para os cultivos em estado sólido (CES) .....	37
4.1.3 Pré-inóculo e meio nutriente para os CES .....	38
4.1.4 CES para a produção de enzimas .....	38
<b>4.2 Determinação da atividade enzimática</b> .....	39
4.2.1 Pectinases .....	39
4.2.2 Xilanases .....	39
4.2.3 Endoglucanases (CMCases) .....	40
4.2.4 FPases .....	40
4.2.5 $\beta$ -glicosidases .....	41
4.2.6 $\beta$ -xilosidases .....	40

<b>4.3 Caracterização físico-química das pectinases</b> .....	41
4.3.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas .....	41
4.3.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato .....	41
4.3.3 Testes de especificidade pelo substrato.....	42
<b>4.4 Purificação parcial das poligalacturonases</b> .....	42
4.4.1 Precipitação de proteínas por saturação com sulfato de amônio .....	42
4.4.2 Diálise.....	42
4.4.3 Clarificação.....	42
4.4.4 Avaliação das frações de proteína por eletroforese em SDS-PAGE .....	43
4.4.5 Zimograma .....	44
<b>4.5 Sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar</b> .....	44
4.5.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino.....	44
4.5.2 Análise das frações da lignocelulose da palha de cana-de-açúcar .....	44
4.5.3 Sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar .....	45
4.5.4 Análise comparativa de açúcares e álcoois por cromatografia iônica .....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>5.1 Avaliação quantitativa inicial da produção de pectinases</b> .....	47
<b>5.2 Caracterização físico-química das pectinases</b> .....	49
5.2.1 Avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática .....	49
5.2.2 Avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade enzimática em ausência de substrato .....	52
5.2.3 Análise dos testes de especificidade pelo substrato .....	54
<b>5.3 Purificação parcial da poligalacturonase</b> .....	55
<b>5.4 Avaliação da produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> JCP 1-4</b> .....	57
<b>5.5 Sacarificação enzimática da palha da cana-de-açúcar</b> .....	58
5.5.1 Caracterização da palha <i>in natura</i> e pré-tratada por tratamento hidrotérmico alcalino .....	58
5.5.1.1 Solubilização de compostos fenólicos totais (CFT) .....	60
5.5.2 Análise comparativa de glicose por cromatografia iônica (HPAEC-PAD).....	60
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

As pectinases correspondem a um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar a pectina da parede celular vegetal por ação desesterificante (pectinesterases), despolimerizante hidrolítica (poligalacturonases) ou despolimerizante por transeliminção (pectina liases) (JAYANI et al., 2005). São enzimas aplicadas em diversos setores, como na clarificação de sucos, na indústria têxtil, na produção de vinhos, na fermentação de café e chás, entre outros, e recentemente têm sido utilizadas também na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração (AMIN et al., 2018; XIA; LI, 2018).

O etanol de segunda geração é obtido a partir de biomassa lignocelulósica, um recurso renovável e cujo processo é amigável ao meio ambiente (SUN; CHENG, 2002; XIAO et al., 2017). O bagaço e a palha da cana-de-açúcar são materiais lignocelulósicos que constituem os principais subprodutos da indústria sucroalcooleira e importantes fontes de açúcar para processos biotecnológicos (CANILHA et al., 2010; FELIPE, 2010; SARKAR et al., 2012; WANDERLEY et al., 2013).

Os açúcares presentes na biomassa lignocelulósica encontram-se na forma de polímeros (celulose e hemicelulose) e são recobertos por lignina, formando uma matriz rígida, responsável pela recalcitrância dessa biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989; KAN et al., 2017; GUO et al., 2018). As camadas de lignina presentes na biomassa lignocelulósica são os principais obstáculos para a sacarificação desse material por hidrólise enzimática, porém ainda existem outros componentes da parede celular vegetal que podem dificultar esse processo, como as pectinas, que dificultam o acesso das enzimas às fibras do substrato, impedindo a ação de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (RODRIGUES et al., 2016; VOLYNETS et al., 2017).

Assim, a produção de etanol a partir da lignocelulose consiste em três passos essenciais: (i) pré-tratamento químico e/ou físico para romper a estrutura cristalina da celulose e retirar parte da lignina; (ii) sacarificação enzimática para a liberação de açúcares fermentescíveis; (iii) fermentação, para a conversão de açúcares em etanol (VIIKARI et al., 2012; SANTOS et al., 2014).



A hidrólise enzimática da lignocelulose requer a ação de um coquetel multi-enzimático composto de celulasas e hemicelulasas (SUHARDI et al., 2013). No entanto, a suplementação do coquetel com enzimas acessórias, como oxidases e pectinases, tem demonstrado eficiência no aumento do rendimento e da velocidade de conversão dos polímeros em monômeros de açúcares (ROBL et al., 2015). As pectinases, quando aplicadas nesse coquetel, atuam sinergisticamente na degradação do material lignocelulolítico, aumentando, conseqüentemente, o rendimento e a eficiência da hidrólise (MAITAN-ALFENAS et al., 2015; ROBL et al., 2015).

Essa aplicação das pectinases requer enzimas que sejam tolerantes às condições da indústria e ao armazenamento, o que implica em moléculas resistentes às temperaturas fora da refrigeração e que atuem em temperaturas acima da mesofílica (acima de 40°C), direcionando às pesquisas de pectinases termofílicas e termoestáveis (GOMES et al., 2007; XIA; LI, 2018).

As enzimas termoestáveis são, geralmente, produzidas por microrganismos termofílicos que crescem otimamente em temperaturas acima de 40°C e raramente em temperaturas abaixo dos 30°C (HASSAN et al., 2018). Os fungos termofílicos são pouco conhecidos, mas extremamente importantes na produção de enzimas de aplicação industrial (ELLEUCHE et al., 2015).

Dentro deste contexto, o presente trabalho visou à produção de pectinases pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC, o conhecimento das características bioquímicas, a purificação parcial e a avaliação do efeito da adição destas ao coquetel enzimático celulolítico e hemicelulolítico, produzido por *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4.

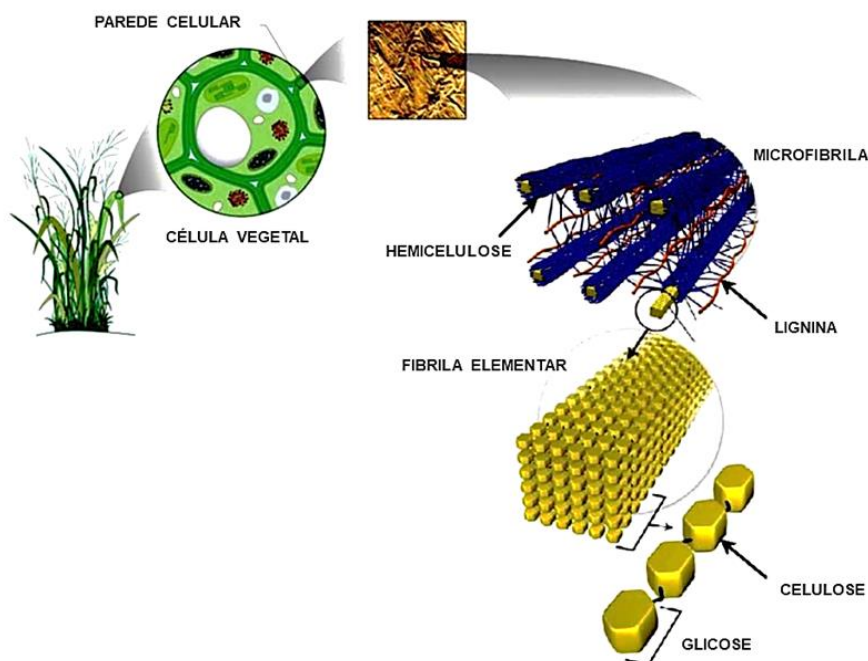
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lignocelulose

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos naturais e pode ser encontrada na natureza em todas as plantas e seus resíduos como os urbanos, agroindustriais e florestais (CARRIER et al., 2011). Essa biomassa é constituída por fibras de celulose e hemicelulose envolvidas em uma matriz amorfa de lignina, as quais estão unidas entre si por ligações covalentes e não covalentes, fazendo com que seja formada uma complexa rede resistente à ação de microrganismos e enzimas (FENGEL; WENEGER, 1989; JEFFRIES, 1990; SANTOS et al., 2012).

A lignocelulose é constituída por 40-50% de celulose, 25-30% de hemicelulose, 15-20% de lignina, traços de pectina, compostos nitrogenados e componentes inorgânicos (MORI et al., 2015) (Figura 1).

**Figura 1.** Origem e organização da lignocelulose.



Fonte: Adaptado de Canilha et al., 2010.

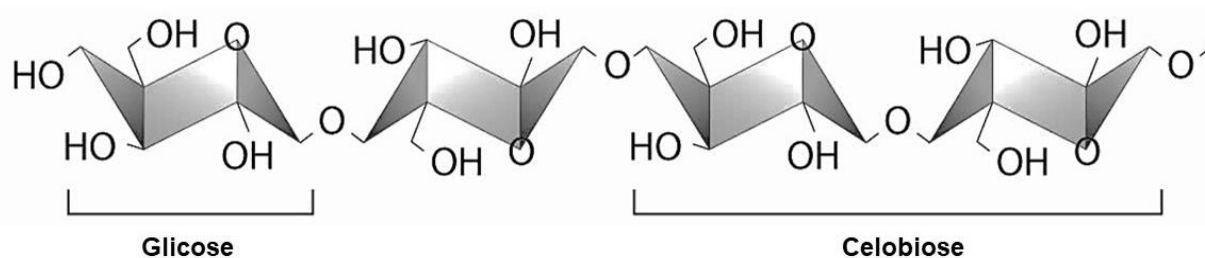
A palha de cana-de-açúcar, que consiste da parte aérea da planta além dos colmos, representa um grande volume de resíduos vegetais resultantes do

processamento da cana no fabrico do açúcar e/ou do etanol (SANTOS et al., 2012). Atualmente, tem sido usada juntamente com o bagaço para a geração de calor e eletricidade, porém com potencial para a produção do etanol celulósico (MORIYA et al., 2007; SANTOS et al., 2012). Apresenta em sua composição 45,1% de celulose, 25,6% de hemicelulose, 14,1% de lignina, 4,3% de pectina e 8% de cinzas, teores muito próximos aos do bagaço, que varia de 41 a 44% de celulose e de 25 a 27% de hemicelulose, exceto nos teores de lignina que podem chegar a 20% (ABIPTI, 1999). É esse menor teor de lignina que faz da palha um alvo de mais fácil sacarificação, entretanto, há uma maior presença de pectina na palha, o que requer enzimas específicas para sua hidrólise.

### 2.1.1 Celulose

A celulose representa o polímero componente de matéria vegetal mais abundante na natureza, existente em todos os tecidos vegetais e algas, e sintetizada por algumas bactérias e grupos específicos de fungos (JONOOBI et al., 2015). Sua estrutura corresponde a um homopolissacarídeo linear constituído por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4, com orientações alternativas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (STELTE et al., 2011). Os dímeros de glicose são denominados celobiose (POLETTI; ORNAGHI JUNIOR, 2015). A sua proporção na biomassa vegetal e a sua composição a torna o maior recurso energético renovável da natureza (CHEN, 2014). A Figura 2 representa a estrutura da molécula de celulose, apontando os monômeros de glicose e celobiose.

**Figura 2.** Estrutura da molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de US Department of Energy Genome Programs (US DOE), 2007.

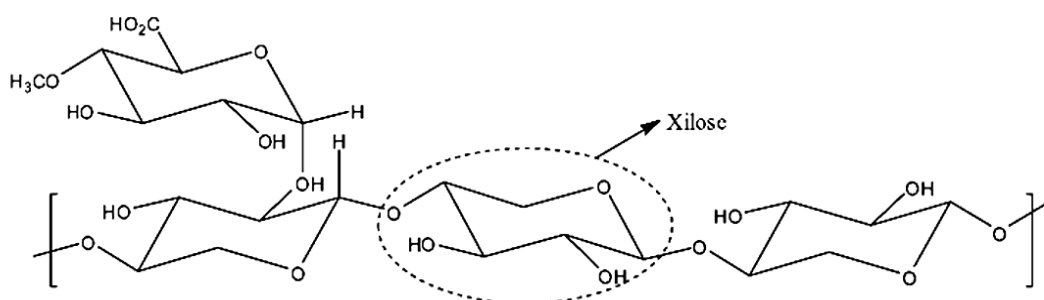
Sua estrutura secundária é caracterizada por meio de ligações de hidrogênio intramoleculares, formando conformações  $\beta$ , as quais se organizam em cadeias que formam microfibrilas, e estas ainda se ligam formando as macrofibrilas, que por fim dão origem às fibras de celulose propriamente ditas (ATALLA et al., 1993; VOUTILAINEN et al., 2007).

De acordo com a organização e compactação das fibrilas, a celulose apresenta regiões cristalinas e amorfas, sendo o caráter cristalino extremamente estável, referente ao maior grau de organização e compactação, e sendo ainda mais suscetível à degradação pela ação de enzimas do que a celulose amorfa (MATHEWS et al., 2015). Além disto, a elevada compactação das moléculas de glicose confere à celulose alta massa molecular, fator este que resulta na insolubilidade da celulose em água (BRANDT et al., 2013).

### 2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo com estrutura mais diversificada que a celulose, sendo composta por pentoses (xilose, ramnose, arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose), açúcares acetilados e ácidos urônicos (ácido  $\alpha$ -D-galacturônico) (GÍRIO et al., 2010; ISIKGOR; BECER, 2015). Dentre os açúcares constituintes, a xilose é um dos mais abundantes (83,1 - 84,6%), coexistindo com arabinose (11,0 - 12,1%) e menores quantidades de glicose (2,1 - 3,1%), ácidos urônicos (1,4 - 2,6%) e galactose (0,5 - 0,7%), conforme mostra a Figura 3 (BIAN et al., 2012).

**Figura 3.** Estrutura da hemicelulose.



Fonte: Santos et al., 2012.

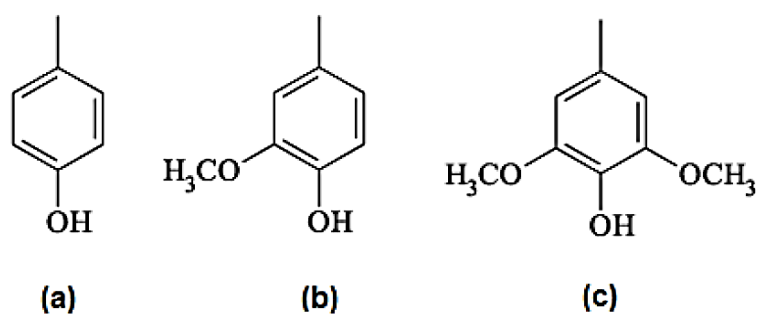
As xilanas, o tipo mais abundante de hemicelulose no reino vegetal, são polímeros lineares compostos por resíduos de xilose unidos através de ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1-4), podendo apresentar várias substituições, além da capacidade de manter ligações com outros polissacarídeos, por meio de ligações laterais (POLIZELI et al., 2005). Ademais, xilanas são comumente acetiladas e fazem ligações éster com ácido p-cumárico e ferúlico, porção ligada à lignina, agindo intensamente com esta (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

### 2.1.3 Lignina

A lignina representa cerca de 20% do carbono total fixado durante a fotossíntese (HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012). É um heteropolímero amorfo presente na parede celular de plantas vasculares, cujo papel biológico é aumentar a integridade da parede celular e promover resistência ao ataque de agentes patogênicos, à oxidação e à degradação enzimática e impermeabilização dos vasos condutores da planta (BROWN; CHANG, 2014).

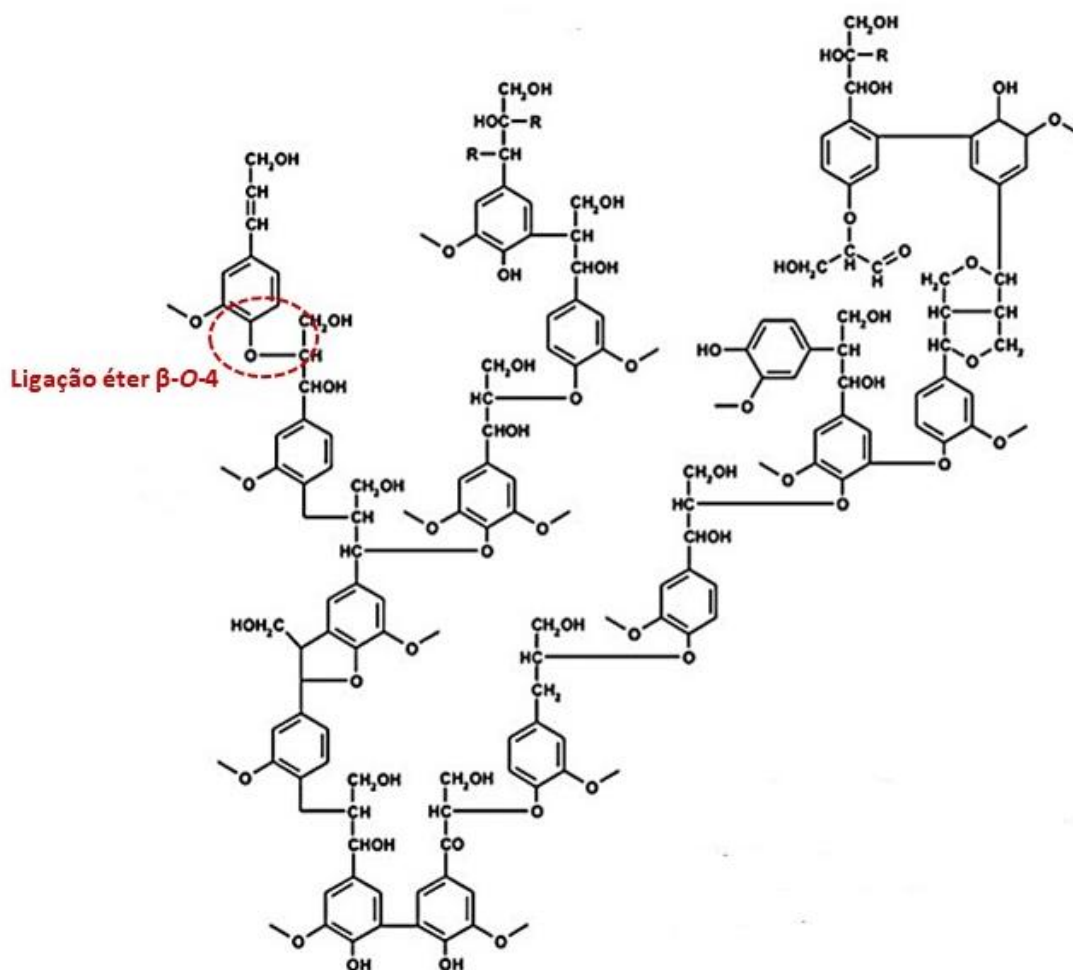
A molécula de lignina é composta por unidades fenilpropanoidicas derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois precursores (coniferílico, sinapílico e p-cumarílico) que, respectivamente, dão origem às subunidades p-hidroxifenila, guaiacila e siringila e interconectadas por ligações carbono/carbono e éter biologicamente estáveis (BOURBONNAIS; PAICE, 1988). As Figuras 4 e 5 representam as unidades constituintes da molécula da lignina e a estrutura do heteropolímero, respectivamente.

**Figura 4.** Unidades de (a) p-hidroxifenila, (b) guaiacila e (c) siringila, formadoras da estrutura da lignina.



Fonte: Saliba et al., 2001.

**Figura 5.** Estrutura da lignina, mostrando a ligação éter  $\beta$ -O-4.



Fonte: Adaptado de Anke; Weber, 2006.

A recalcitrância da lignocelulose está relacionada ao índice de cristalinidade da celulose, à composição e teor da lignina, e às ligações entre a hemicelulose e a lignina na parede celular das plantas, de forma que o processo de deslignificação se torna essencial para o acesso das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas durante o processo de hidrólise (LI et al., 2015).

## 2.2 Enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico

As enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico, disponíveis comercialmente e mais comumente utilizadas, são geralmente as produzidas por

fungos, devido à elevada capacidade de secreção de proteínas extracelulares, característica desse grupo microbiano (PHITSUWAN et al., 2013).

### 2.2.1 Celulases

As celulases desempenham um papel fundamental na hidrólise da biomassa lignocelulósica por liberar monômeros de açúcares fermentescíveis para a produção de biocombustíveis (FALKOSKI et al., 2013). Estas constituem um grupo de glicosil-hidrolases (GH), responsáveis por atuar nas ligações glicosídicas entre os resíduos de glicose da cadeia de celulose e que envolve a ação sinérgica de um complexo de três enzimas diferentes, específicas para cada sítio da molécula, sendo estas (HORN et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2018):

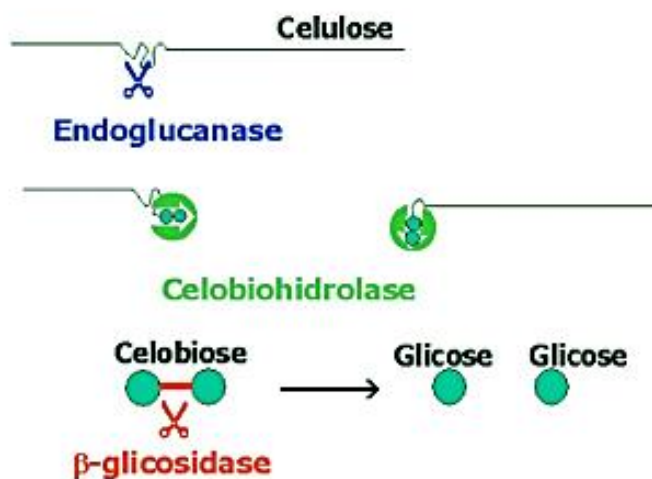
I. Endoglucanases ou CMCases (EC 3.2.1.4): atuam na catalisação da hidrólise da celulose, rompendo as ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) presentes na estrutura amorfa (de baixa cristalinidade), liberando celo-oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, expondo novos terminais (um redutor e um não redutor) (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Estas são ainda responsáveis pela rápida solubilização do polímero de celulose, visto que diminui seu grau de polimerização, devido à liberação de oligossacarídeos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010);

II. Celobiohidrolases ou exoglucanases ou avicelases (EC 3.2.1.176): catalisam a quebra das ligações glicosídicas, tanto nas regiões cristalinas, quanto nas regiões amorfas, a partir das extremidades redutoras e não redutoras das cadeias, liberando unidades de celobiose e celo-oligossacarídeos (a diminuição do grau de polimerização ocorre de forma lenta) (COUGHLAN; LJUNGDAHL, 1988; VOUTILAINEN, 2010).

III.  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21): são responsáveis pela hidrólise da celobiose e de outras celodextrinas à glicose, contribuindo para a finalização do processo catalítico da celulose (VOUTILAINEN et al., 2007; LEITE et al., 2008). Assim, tornam-se o fator limitante e são responsáveis pela regulação de todo o processo celulolítico (YEOMAN et al., 2010).

O sinergismo entre essas enzimas depende da natureza do substrato sobre os quais elas atuam (WOODWARD, 1991). A Figura 6 representa a atuação destas enzimas.

**Figura 6.** Ação catalítica do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptado de Tébéka et al., 2009.

### 2.2.2 Hemicelulases

A hidrólise da hemicelulose requer um conjunto mais complexo de enzimas principais e de enzimas acessórias, que são necessárias para aumentar o rendimento da hidrólise (MAITAN-ALFENAS et al., 2015). Tal complexo inclui enzimas que degradam todas as frações da hemicelulose, podendo quebrar xilana, xilobiose, manana, arabinana, ácido galacturônico, entre outras (MADADI et al., 2017). Porém, como o principal constituinte da hemicelulose é a xilana, enfoques quanto às enzimas hemicelulolíticas são baseados em xilanase e  $\beta$ -xilosidase (BIAN et al., 2012).

As xilanases (ou endo-1,4- $\beta$ -D-xilanases; EC 3.2.1.8) hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$ -D-xilosídicas randomicamente, diminuindo o grau de polimerização do polissacarídeo, liberando xilobiose e outros xilo-oligossacarídeos (SWEENEY; XU, 2012).

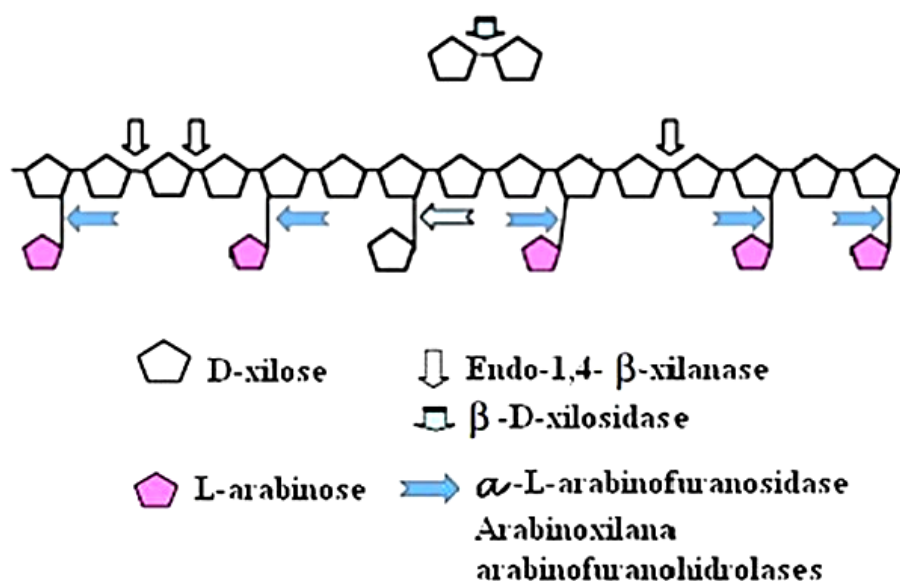


As  $\beta$ -xilosidases (ou 1,4- $\beta$ -D-xilosidases; EC 3.2.1.37) possuem afinidade por xilobiose e xilo-oligossacarídeos e atuam a partir do terminal não redutor da xilana, liberando xilose como produto final (SARASWAT; BISARIA, 1997; KOLENOVA et al., 2006; RASMUSSEM et al., 2006; BUSSAMRA et al., 2015).

Além das xilanases e das  $\beta$ -xilosidases, as acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e as  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) também são importantes enzimas acessórias, visto que catalisam a remoção das cadeias laterais da hemicelulose (GILEAD; SHOHAM, 1995).

A Figura 7 representa a estrutura da arabinoxilana com a ação de algumas enzimas do complexo hemicelulolítico.

**Figura 7.** Ação de diversas enzimas na estrutura da arabinoxilana.



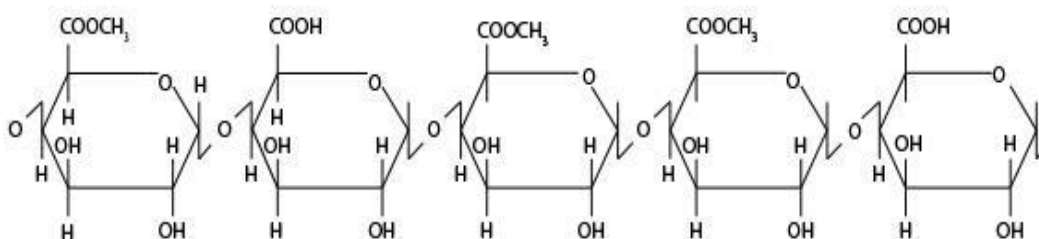
Fonte: Adaptado de Aro et al., 2005.

### 2.3 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais de alta massa molar constituídos por resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 8) (DOCO et al., 1997; TAPRE; JAIN, 2014). Essas substâncias compõem a lamela média e a parede celular primária nas células vegetais, sendo que na

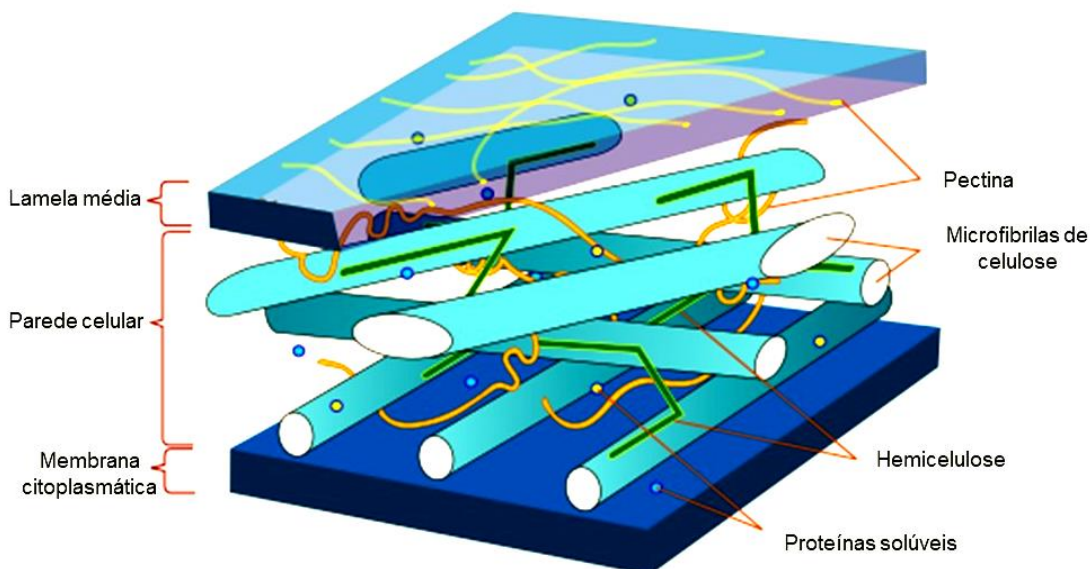
parede primária formam uma matriz na qual a celulose e hemicelulose estão embutidas (CAFFAL; MOHNEN, 2009). A pectina contribui para a força mecânica e para as propriedades físicas, de forma a auxiliar na manutenção da integridade e na defesa contra patógenos (LINGXIA; STEVEN, 2010). A Figura 9 representa a estrutura da parede celular vegetal, mostrando a localização da pectina nos tecidos vegetais.

**Figura 8.** Sequência principal da pectina.



Fonte: Adaptado de Serra et al., 2002.

**Figura 9.** Diagrama da parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de Villareal, 2007.

Apesar de o principal constituinte dessas substâncias ser o ácido galacturônico, outros açúcares podem ser encontrados, tais como ramnose (na cadeia principal), arabinose, galactose e xilose (nas cadeias laterais) (YADAV et

al., 2009). Estes polissacarídeos podem ser classificados em três grupos principais, com base na organização das cadeias central e lateral que os constituem e do tipo dos resíduos de açúcar (ALKORTA et al., 1998; JAYANI et al., 2005; WILLATS et al., 2006; PEDROLLI et al., 2008; BHARDWAJ et al., 2017):

**I. Homogalacturonana (HG):** polímero linear formado por ácido D-galacturônico, podendo ser esterificado com grupos metil ou acetil.

De acordo com o nível de esterificação, os polímeros de HG podem ser classificados em pectina, ácido pectínico, ácido péctico (ácido poligalacturônico) e protopectina. Pectina é um termo genérico para a mistura de diferentes composições, porém com ácido pectínico como principal componente. A protopectina é um termo utilizado para as substâncias insolúveis em água encontradas nos tecidos vegetais, a partir da qual as substâncias pécticas solúveis são produzidas, visto que são pouco hidrolisáveis quando comparadas à pectina ou ácido péctico. Os ácidos pécticos (ácido poligalacturônico) são essencialmente livres de esterificações. E, por fim, os ácidos pectínicos contêm menos que 75% de grupos carboxílicos metilados.

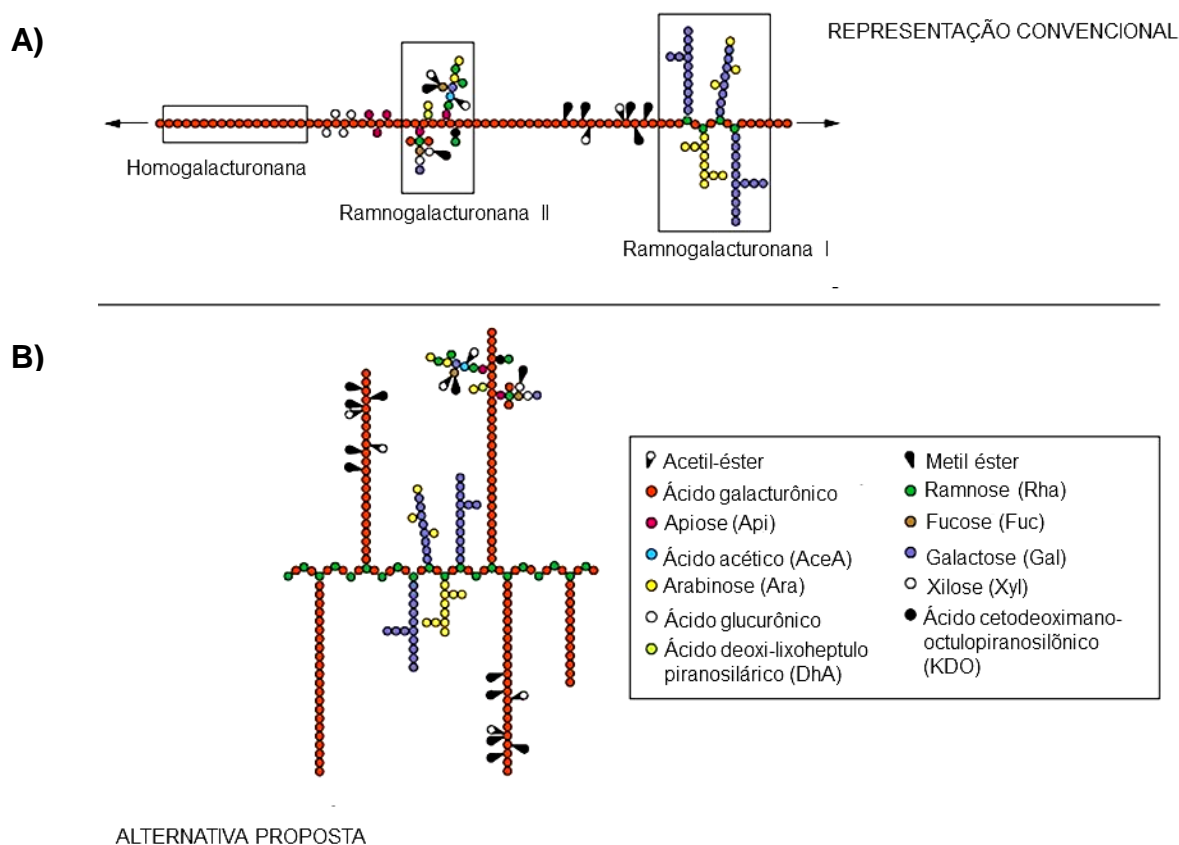
**II. Ramnogalacturonana I (RGI):** composto pela sequência dissacarídeo ramnose – ácido galacturônico, cujos resíduos podem ser acetilados. Uma variedade de diferentes cadeias de glucanas (principalmente arabinana e galactana) está ligada às unidades de ramnose, sendo que estas cadeias podem ser extremamente heterogêneas.

**III. Ramnogalacturonana II (RGII):** é também uma cadeia HG, porém apresenta um esqueleto de no mínimo oito (provavelmente mais) unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares complexos.

O HG é o polímero mais abundante na parede celular, correspondendo entre 60 e 65% do total da pectina, enquanto que RGI corresponde entre 20 e 35%, e RG-II somente 10% (CANTERI et al., 2012). Estudos permitiram esquematizar estruturas hipotéticas da pectina, com breves modificações de

acordo com novas evidências analíticas (CANTERI et al., 2012). A Figura 10 representa a alternativa de Willats et al. (2006), a partir da representação convencional.

**Figura 10.** Estrutura da pectina. Representação esquemática da convencional (A) e da alternativa recentemente proposta (B).



Fonte: Adaptado de Willats et al. (2006).

## 2.4 Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas (pectinases) constituem um grupo de enzimas complexas que catalisam a degradação das substâncias pécticas, tanto por reações de despolimerização quanto de desesterificação (TARIQ; LATIF, 2012). A pectina presente na parede celular é envolvida em ligações com fibras de celulose e hemicelulose e, desse modo, a ação das pectinases, removendo essa pectina facilitam o acesso de celulasas ao seu substrato (GIACOBBE et al., 2014).

As pectinases são classificadas de acordo com a preferência pelo substrato, pelo modo de ataque à cadeia de ácido galacturônico dos polímeros pécticos e pela preferência pelo tipo de clivagem, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo) ou a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) (PILNIK; ROMBOUTS, 1981; WHITAKER, 1990; SAKAI, 1992; KASHYAP et al., 2001).

Com base nas classificações, são descritos três tipos de enzimas: as protopectinases (hidrólise ou transeliminação), as desesterificantes (pectinesterases) e as despolimerizantes (hidrolases e liases).

**1. Protopectinases:** solubilizam a protopectina insolúvel, formando pectina polimerizada altamente solúvel (JAYANI et al., 2005). Estas podem ser divididas em tipo A, que atuam na região do ácido poligalacturônico da protopectina, e tipo B, que atuam nas cadeias de polissacarídeos que conectam as cadeias de ácido poligalacturônico aos demais constituintes da parede celular vegetal (KASHYAP et al., 2001).

**2. Enzimas desesterificantes (pectinesterases ou pectinametilhidrolases; EC 3.1.1.11):** catalisam a desesterificação do grupo metoxil da pectina, formando ácido péctico ou pectina de baixa metoxilação (KASHYAP et al., 2001). Agem preferencialmente nos grupos éster e metil do galacturonato até a próxima unidade de galacturonato não esterificado (COSGROVE, 1997; KASHYAP et al., 2001). São as primeiras enzimas a atuar na degradação da pectina, liberando grupos carboxílicos livres e, permitem então que as demais enzimas atuem no produto (SAKAI et al., 1993).

**3. Enzimas despolimerizantes:** rompem as ligações glicosídicas  $\alpha$  (1→4) entre os monômeros de ácido galacturônico, podendo agir por dois mecanismos diferentes - hidrólise (poligalacturonases) ou transeliminação (liases) (JAYANI et al., 2005).

São subdivididas da seguinte forma:

**a) Hidrolases (poligalacturonases e polimetilgalacturonases):** as poligalacturonases (PGs) catalisam a quebra da cadeia de ácido poligalacturônico por hidrólise, ou seja, pela introdução de molécula de água (JAYANI et al., 2005). Tais enzimas podem ser endo-PGs (EC 3.2.1.15), que hidrolisam de forma randômica as ligações entre os resíduos de ácido galacturônico (ácido péctico), liberando oligogalacturonatos, ou exo-PGs (EC 3.2.1.67), que catalisam a hidrólise das cadeias a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos monogalacturônicos (JAYANI et al., 2005).

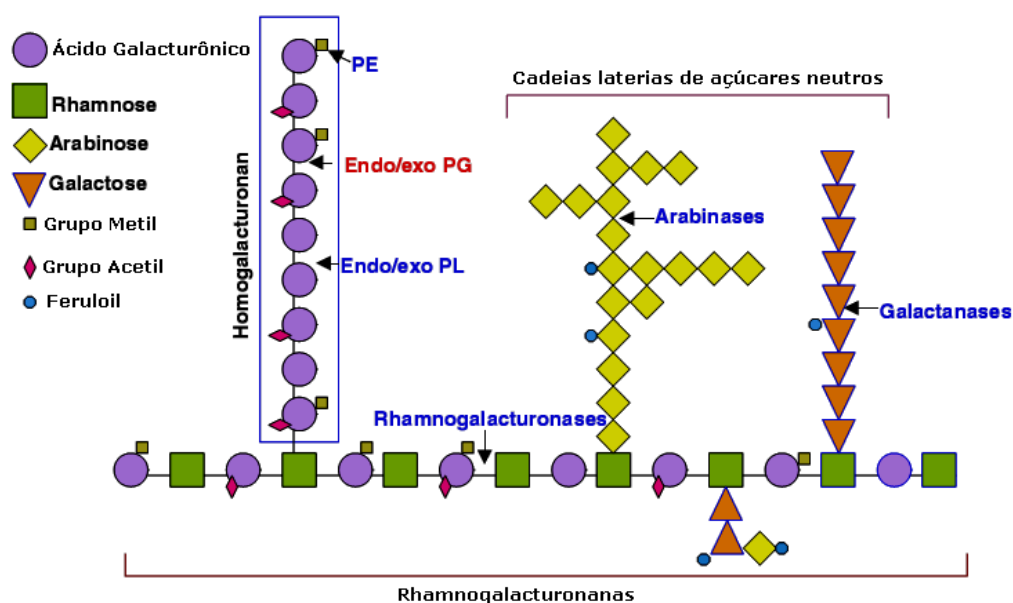
As polimetilgalacturonases são também hidrolases que catalisam a quebra das ligações glicosídicas  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), se diferenciando das poligalacturonases pela preferência por substratos altamente metoxilados (ácido pectínico) e podendo exibir atividades endo (clivagem randômica da cadeia), ou exo (clivagem sequencial a partir da extremidade não redutora da cadeia) (JAYANI et al., 2005; TAPRE; JAIN, 2014).

**b) Liasas (pectina liases e pectato liases):** clivam as ligações de pectatos ou pectinatos por transeliminação do hidrogênio, resultando em galacturonídeos com ligações insaturadas entre C4 e C5, sendo subdivididas de acordo com a especificidade pelo substrato (CODNER, 2001; KASHYAP et al., 2001). Tais enzimas podem apresentar atividade endo, ou seja, quando clivam as ligações de forma randômica, ou exo, quando clivam as ligações da cadeia a partir da extremidade não redutora (ALKORTA et al., 1998; JAYANI et al., 2005).

As liases ainda são subdivididas em relação a preferência por substrato, sendo que as que têm preferência por ácido péctico (ácido galacturônico) são denominadas poligalacturonato liases (pectato liases), enquanto que as liases que atuam no ácido pectínico são as polimetilgalacturonato liases (pectina liases) (KASHYAP et al., 2001).

A Figura 11 e a Tabela 1 representam a composição da molécula de pectina e o mecanismo de ação de algumas das enzimas citadas:

**Figura 11.** Componentes da molécula de pectina, com associação de açúcares e atuação das pectinases.



Fonte: Adaptado de Vincken et al., 2003.

**Tabela 1.** Classificação das pectinases com base no modo de ação.

ENZIMA	EC	SUBSTRATO	MODO DE AÇÃO	PRODUTO
<b>Esterases</b>				
Pectinesterases	3.1.1.11	Pectina	Hidrólise	Ácido péctico + metanol
<b>Despolimerases (hidrolases)</b>				
Protopectinases		Protopectina	Hidrólise	Pectina
Endopoligalacturonases	3.2.1.15	Ácido péctico	Hidrólise	Oligogalacturonatos
Exopoligalacturonases	3.2.1.67	Ácido péctico	Hidrólise	Monogalacturonatos
<b>Despolimerases (liases)</b>				
Endo pectato liases	4.2.2.2	Ácido péctico	Transeliminação	Oligogalacturonatos
Exo pectato liases	4.2.2.9	Ácido péctico	Transeliminação	insaturados
Pectina liase	4.2.2.10	Pectina	Transeliminação	

Fonte: Adaptado de Venkatanagaraju; Divakar, 2017.

## 2.5 Aplicações das enzimas pectinolíticas

As primeiras aplicações comerciais de pectinases foram observadas em 1930 para o preparo de vinhos e sucos de frutas (OSLEN, 2000). Porém, foi na década de 60 que teve início o conhecimento da natureza de tecidos vegetais, e com isso, cientistas começaram a utilizar uma melhor extensão de enzimas mais eficientes (TAPRE; JAIN, 2014). Como resultado, as pectinases têm sido importantes enzimas do setor comercial, especialmente pelas indústrias de sucos de frutas, sendo usadas como pré-requisitos para a obtenção de maiores rendimentos na estabilidade e clarificação destes (SANDRI et al., 2013). As pectinases ácidas são usadas principalmente na indústria de bebidas, enquanto que as alcalinas, por exemplo, são usadas no processamento têxtil, na indústria de papel e na extração de óleos (REID; RICARD, 2000; BONNIN et al., 2003).

As pectinases têm diversas aplicações, e são muito importantes principalmente na extração de sucos de frutas com alto teor de pectina, como manga, mamão, goiaba, maçã e banana, visto que essas enzimas removem a pectina e outras substâncias, conferindo menor turbidez, amargor e viscosidade aos sucos (SANDRI et al., 2013; TAPRE; JAIN, 2014). Também são importantes na clarificação destes e de vinhos, pois, além de resultar em melhores rendimentos de tal processo, ainda auxiliam a preservar nutrientes, cor e sabor originais (TAPRE; JAIN, 2014). Porém, apesar de serem extensamente aplicadas na indústria de sucos e vinhos, ainda apresentam outras aplicações excepcionais, como as citadas nos exemplos a seguir:

- Fabricação de papel e celulose: atuam despolimerizando os resíduos de ácido galacturônico, resultando em um papel mais volumoso, com menor opacidade e melhor capacidade de impressão (BAJPAI, 2014; KOHLI; GUPTA, 2015);

- Fermentação de café e chá: pectinases alcalinas têm sido utilizadas na fermentação do chá para evitar a formação do pó instantâneo através da destruição da pectina, e para a remoção da camada mucilaginosa do grão do café (KOHLI; GUPTA, 2015);

- Ração animal: as enzimas têm sido usadas recentemente na produção de oligossacarídeos pécticos como componentes funcionais da ração, visto que



diminuem a viscosidade, a fim de aumentar a liberação e absorção de nutrientes (UENOJO; PASTORE, 2007; COMBO et al., 2012; SABAJANES et al., 2012);

- Extração de óleos: óleos cítricos podem ser extraídos com pectinases, uma vez que estas enzimas destroem as propriedades emulsionantes da pectina, que interferem na recuperação de óleos a partir de extratos de casca de frutas cítricas (KOHLI; GUPTA, 2015). As pectinases atuam hidrolisando os complexos de pectina-proteína, liberando o óleo, aumentando o rendimento, diminuindo o tempo de processo e melhorando a qualidade do produto final (KASHYAP et al., 2001).

- Controle de patogenicidade em plantas: a patogenicidade em plantas e frutos são sinais de ação de pectinases, que pode estimular a resistência da planta agindo como agente de controle biológico e evitando o uso de agroquímicos excessivos, como por exemplo, a pectina liase de *Bacillus clausii* (JAYANI et al., 2005; LI et al., 2012).

- Indústria têxtil: as pectinases podem ser aplicadas para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais (KASHYAP et al., 2001; KAUR et al., 2004).

## **2.6 Pectinases fúngicas e termoestáveis**

A fonte primária da produção de enzimas industriais são os microrganismos, dos quais 50% são produzidas por fungos e leveduras, 35% por bactérias e os 15% remanescentes são de origem vegetal (JAYANI et al., 2005). Recentemente, tem se aumentado o interesse em pectinases termofílicas e termoestáveis, visto que o uso de elevadas temperaturas é um importante fator durante o processamento de suco e outros produtos vegetais, que são etapas importantes dos processos industriais com diversas finalidades (GOMES et al., 2007; ZHOU et al., 2017). Por exemplo, durante a maceração da uva o uso de temperaturas mais altas (entre 60 e 65°C) favorece o processamento do suco pela ruptura da membrana e da parede celular. Além disso, processamento em temperaturas mais elevadas diminuem os riscos de contaminação microbiana (GOMES et al., 2007).

Os fungos constituem um grupo morfológica e fisiologicamente diverso, com estimativa de espécies em torno de 1,5 milhão (HAWKSWORTH et al., 2001; MADIGAN et al., 2003). Cooney e Emerson (1964) classificaram como fungos termofílicos aqueles com temperatura máxima de crescimento a 50°C ou acima e apresentam temperatura mínima a 20°C ou acima. Há teorias que relatam o surgimento da termofilia em fungos como um mecanismo adaptativo às mudanças sazonais e às altas temperaturas diurnas, e tal mecanismo envolve aspectos como ajustamento da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às altas temperaturas (GOMES et al., 2007; POWELL et al., 2012). Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse principalmente na biotecnologia, visto que esses microrganismos apresentam, conseqüentemente, proteínas e enzimas resistentes às altas temperaturas e às condições drásticas utilizadas em bioprocessos (HAKI; RAKSHIT, 2003).

Dado que a pectina é um constituinte importante da parede celular vegetal, espera-se que as pectinases sejam também comuns entre os termófilos decompositores de polímeros vegetais (GOMES et al., 2007). No entanto, poucos relatos são apresentados na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI et al., 2000; GOMES et al., 2007).

Inamdar (1987) estudou 40 linhagens termofílicas, das quais apenas 7 gêneros foram capazes de crescer em meio líquido contendo pectina. Destes, somente a espécie *Thermoascus aurantiacus* produziu quantidades consideráveis de pectinase em meio à base de casca de citrus. A mesma linhagem foi também estudada por Martins et al. (2002), os quais relataram a produção de poligalacturonases em cultivo em estado sólido, contendo farelo de trigo e bagaço de laranja como substrato.

Alves et al. (2002) isolaram 56 espécimes do gênero *Mucor*, totalizando 11 táxons, a partir de fezes de herbívoros. Destes, 96% produziram poligalacturonases em meio contendo pectina cítrica como substrato.

Kaur et al. (2004) estudaram a produção de uma poligalacturonase termoestável por uma forma termofílica de *Sporotrichum thermophile apinis* em CSM.

Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) reportaram a produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* por CSM em meio com 1% de pectina e sacarose.

Phutela et al. (2005) reportaram a produção de poligalacturonases pelo fungo termofílico *Aspergillus fumigatus* em cultivo em estado sólido.

As pectinases fúngicas são produzidas de forma promissora através do cultivo em estado sólido (CES), devido à semelhança com o ambiente natural destes microrganismos (CASTILHO et al., 2000). Dentre as vantagens do CES destacam-se: baixo custo, visto que os substratos utilizados são resíduos agroindustriais; melhor qualidade dos produtos finais quando comparados com o cultivo submerso; requer uma menor quantidade de energia; é uma prática sustentável; e proporciona uma hiperprodução de metabólitos microbianos (FAVELA-TORRES et al., 2006; JACOB, 2009; PEDROLLI; CARMONA, 2010).

Recentemente, as pectinases têm sido selecionadas com o propósito de auxiliar na sacarificação de materiais lignocelulósicos visando à obtenção de açúcares fermentescíveis (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

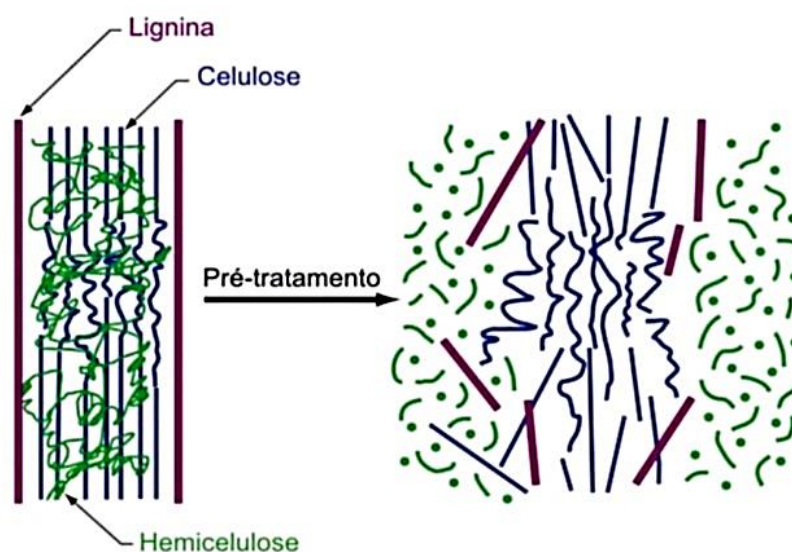
## **2.7 Sacarificação enzimática da biomassa lignocelulósica**

A produção de etanol a partir de material lignocelulósico envolve dois processos: a hidrólise da celulose presente na biomassa para produzir açúcares redutores, seguida da fermentação desses açúcares, convertendo-os em etanol (SUN; CHENG, 2002). A hidrólise enzimática é catalisada por um *pool* de enzimas descritas anteriormente, produzidas por diversos microrganismos, especialmente os fungos termofílicos (MAEDA et al., 2013). Isto ocorre porque, no geral, eles utilizam resíduos lignocelulósicos como substrato na produção de enzimas por cultivo em estado sólido (CES) e conseguem suportar aumentos de temperaturas – comuns durante o CES, produzindo enzimas mais estáveis nessas altas temperaturas, quando comparados a fungos mesofílicos (GOMES et al., 2007).

Em função da complexidade da lignocelulose, faz-se necessário uma prévia desagregação da estrutura desse material antes da aplicação das enzimas, de modo a facilitar o acesso das mesmas aos seus respectivos substratos por meio de um tratamento químico e/ou físico (IBRAHIM, 2012). Esse pré-tratamento

do material lignocelulósico tem por objetivos a abertura da parede celular da biomassa para o ataque enzimático, o aumento da área de superfície e da porosidade do substrato, a redução da cristalinidade da celulose e a remoção da lignina e da hemicelulose, fatores que facilitam o acesso das enzimas ao material e aumentam o rendimento do processo, como mostra a Figura 12 (IBRAHIM, 2012).

**Figura 12.** Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina decorrentes de técnicas de pré-tratamento.



Fonte: Kondo, 1997.

Na etapa da sacarificação vários obstáculos ainda podem surgir como ineficiência ou inativação das enzimas na condição de aplicação ou falta de algum tipo enzimático específico no coquetel (SUN; CHENG, 2002). A otimização das celulasas e da carga enzimática utilizada também estão associadas a um melhoramento do processo (SUN; CHENG, 2002). Sendo assim, a hidrólise enzimática da biomassa depende não apenas do coquetel enzimático utilizado para a liberação de açúcares, mas também do pré-tratamento empregado e da eficiência das enzimas (MAITAN-ALFENAS et al., 2015).

O pré-tratamento hidrotérmico tem se destacado por promover o aumento da degradação enzimática da celulose e por produzir baixas quantidades de compostos inibitórios para as enzimas e para o processo de fermentação

alcoólica subsequente (LIMAYEM; RICKE, 2012). Tal processo é baseado na combinação do uso de água (ou vapor d'água) com altas temperaturas (120-230°C) e elevadas pressões, atuando no rompimento das ligações lignina-carboidrato (ROGALINSKI et al., 2008). Porém, ainda não é considerado suficiente na degradação da lignina, sendo assim combinado com a extração alcalina, um dos procedimentos mais utilizados na deslignificação, resultando numa remoção mais eficiente da lignina e contribuindo para uma hidrólise enzimática mais rápida e com um maior rendimento em açúcares (BOUSSARSAR et al., 2009; SILVA et al., 2011; ROCHA et al., 2012).

A extração alcalina é eficaz na deslignificação porque atua tanto no rompimento das ligações entre lignina e carboidrato, quanto de suas ligações internas, conseqüentemente melhorando a reatividade dos polissacarídeos remanescentes, aumentando o entumescimento da biomassa e a área de superfície destes (CHEN et al., 2011; KARP et al., 2013).

Na etapa de sacarificação enzimática sabe-se que, em termos de velocidade de conversão e de rendimento, o coquetel enzimático utilizado na hidrólise, quando suplementado com enzimas acessórias, como as pectinases, torna-se mais eficiente (BERLIN et al., 2007). Maitan-Alfenas et al. (2015) constataram que as pectinases favoreceram a sacarificação do bagaço de cana e contribuíram para uma melhor ação do coquetel enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e de um coquetel enzimático comercial, visto que estas são fundamentais dentro do efeito sinérgico entre as enzimas. Também tem sido constatado que a hidrólise da biomassa não depende unicamente da presença isolada da ação de celulases, mas a degradação eficiente é uma função da proporção balanceada de enzimas diferentes que agem sinérgicamente na quebra da estrutura complexa da lignocelulose (HU et al., 2011; VÁRNAI et al., 2011; VAN DYK; PLETSCHE, 2012; MAITAN-ALFENAS et al., 2015; ROBL et al., 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Caracterizar pectinases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC quanto às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, e mensurar o efeito de sua adição na formulação de coquetel enzimático composto por celulases e xilanases para sacarificação da palha da cana-de-açúcar.

#### 3.2 Objetivos específicos

- I. Produzir as pectinases em cultivo em estado sólido (CES) utilizando a mistura de bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja como substrato;
- II. Avaliar os efeitos das condições de reação como temperatura e pH sobre a atividade e sobre a estabilidade das pectinases;
- III. Produzir celulases e xilanases em cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 em estado sólido (CES) utilizando a mistura de farelo de soja e bagaço de cana-de-açúcar como substrato;
- IV. Avaliar o efeito da adição das poligalacturonases ao coquetel enzimático de hidrólise da palha de cana-de-açúcar.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo em estado sólido

#### 4.1.1 Microrganismos utilizados

A linhagem fúngica utilizada para a produção das pectinases foi a cepa *Rasamsonia emersonii* BC, isolada de amostras de bagaço de cana em Adolfo - SP e faz parte da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (ROSA, 2014).

A linhagem utilizada para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas foi a cepa *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4, a qual faz parte da coleção de trabalho do Laboratório (CASSIA PEREIRA et al., 2015).

Ambas as culturas puras foram mantidas em criotubos, sob solução de glicerol a 20% em freezer a -80°C.

#### 4.1.2 Substratos para os cultivos em estado sólido (CES)

Para a condução dos CES foram utilizados 5,0 g de substrato, sendo estes compostos por:

**a)** para a produção de pectinases pelo fungo *R. emersonii* BC, conforme Silva et al. (2005) e Martins et al. (2002).

- Bagaço de laranja;
- Bagaço de cana-de-açúcar;
- Mistura de bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar, na proporção de 90 para 10%, respectivamente.

**b)** para a produção de celulasas e xilanases pelo fungo *M. thermophila* JCP 1-4, segundo descrito por Cassia Pereira et al. (2015).

- Mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1 p/p).

Ambos os substratos foram lavados, secos a 65°C, triturados e separados em partículas de 1-5 mm utilizado-se uma peneira.

### 4.1.3 Pré-inóculo e meio nutriente para os CES

Os fungos foram inoculados na superfície de meio de cultura *Sabouraud* em placa de Petri e incubados até completo crescimento micelial (96 horas). O fungo *R. emersonii* BC foi incubado a 55°C, enquanto que o *M. thermophila* JCP 1-4 foi incubado a 45°C.

Após este período, discos obtidos das culturas miceliadas em meio de cultura sólido, com 8,0 mm de diâmetro, foram utilizados como inóculo (1 disco por g de substrato). Ao substrato sólido inoculado foram adicionados 20 mL de solução nutriente estéril para as CES do *R. emersonii* BC, e 11 mL para o *M. thermophila* JCP 1-4, de modo a proporcionar uma umidade inicial de aproximadamente 70%.

A solução nutriente foi composta por (g L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5); CaCl<sub>2</sub> (0,5); Tween 80 (10), a pH 5,0.

### 4.1.4 CES para a produção de enzimas

Os CES foram realizados em embalagens de polipropileno (12X20 cm), as quais foram incubadas após a adição da solução de inóculo (item 4.1.3).

Apesar da cepa *R. emersonii* BC crescer a 60°C, a incubação foi feita a 55°C para evitar o ressecamento excessivo do substrato, e, ainda, foi adicionado um recipiente contendo água destilada no interior da estufa para garantir umidade para o crescimento dos fungos. As amostras foram tomadas a cada 48 horas, retirando-se uma embalagem de cada um dos tipos de substrato, por um período de 14 dias. Ao material fermentado retirado foram adicionados 100 mL de água destilada e, após a homogeneização manual, foi mantido sob agitação em shaker a 100 rpm por 30 minutos. Posteriormente o material foi filtrado e centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 5°C, sendo o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta.

A cepa *M. thermophila* JCP 1-4 foi incubada a 45°C por 96 horas, sendo que posteriormente foram adicionados 50 mL de água destilada ao material fermentado, o qual foi homogeneizado manualmente e mantido sob agitação em shaker a 100 rpm por 1 hora. O material foi filtrado e centrifugado a 10000 g por



15 minutos a 5°C, sendo o sobrenadante utilizado como solução enzimática bruta (CASSIA PEREIRA et al., 2015).

## **4.2 Determinação da atividade enzimática**

Foram determinadas as atividades de pectinases, xilanases, endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases das soluções produzidas pelos dois microrganismos utilizados – *Rasamsonia emersonii* BC e *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 –, e, devido ao fato de que apenas a solução do primeiro foi submetida ao processo de purificação parcial, esta teve suas atividades enzimáticas quantificadas antes e após o processo. As atividades de  $\beta$ -xilosidases e celulase em papel filtro (FPases) foram determinadas apenas pela solução produzida pelo *M. thermophila* JCP 1-4.

### **4.2.1 Pectinases**

A atividade enzimática foi determinada através de uma mistura de reação contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução tampão acetato-NaOH a 0,1 M, pH 5,0, contendo 1% de pectina citrus. Tal mistura foi então incubada a 50 °C por 10 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), para a quantificação de açúcares redutores, com base na curva padrão de ácido galacturônico (quantificação em espectrofotômetro a 540 nm). Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de reação.

### **4.2.2 Xilanases**

A atividade de xilanase foi determinada por procedimento idêntico ao descrito no item anterior (4.2.1), porém utilizando-se xilana Birchwood (Sigma X0502) (10,0 g L<sup>-1</sup>) como substrato e curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de açúcar redutor (xilose) por minuto, nas condições de reação.

### 4.2.3 $\beta$ -xilosidases

Para determinar a atividade de  $\beta$ -xilosidases, 0,05 mL da solução enzimática foi adicionada à mistura de 0,25 mL de solução tampão acetato (0,1 M, pH 5,0) e 0,25 mL de 4-nitrofenol- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (PNPX, Sigma). A reação foi mantida a 50°C, por 10 minutos, e interrompida com a adição de 2,0 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M). O p-nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação utilizando curva padrão obtida com solução de nitrofenol em variadas concentrações.

### 4.2.4 FPases

A atividade de celulase em papel de filtro (FPase) foi avaliada como proposto por Ghose (1987) em mistura de reação composta por 1,0 mL de tampão acetato 0,05 M, pH 4,8, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1 de 1 x 6,0 cm embebido no fundo do tubo, e 0,5 mL de solução enzimática. Após uma hora de reação, a 50°C, a mesma foi paralisada em banho de gelo e quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pelo método DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto de reação, com base na curva analítica de glicose.

### 4.2.5 Endoglucanases (CMCases)

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada por procedimento idêntico ao descrito nos itens anteriores (4.2.1 e 4.2.2), porém utilizando-se carboximetilcelulose (CMC – Sigma C5768) (40,0 g L<sup>-1</sup>) como substrato e curva padrão de glicose. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação.

#### **4.2.6 $\beta$ -glicosidases**

A atividade de  $\beta$ -glicosidases foi avaliada por procedimento idêntico ao descrito para  $\beta$ -xilosidases (item 4.2.3), exceto pela substituição do substrato pelo 4-nitrofenol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mM) – PNPG, Sigma).

### **4.3 Caracterização físico-química das pectinases**

#### **4.3.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas**

Para a determinação dos efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática, a reação foi conduzida como descrito no item 4.2.1, porém em soluções-tampão com pH variando entre 3,0 e 10,0. As soluções-tampão utilizadas foram (0,1 M): citrato de  $N_2$  (pH 3,0); acetato-NaOH (pH 3,5-5,5); MES (pH 6,0-6,5); HEPES (pH 7,0-7,5); glicina (pH 8,0-9,5) e CAPS (pH 10,10-5).

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado utilizando o tampão cujo pH foi determinado como melhor para atividade da enzima, variando-se a temperatura de incubação entre 30 e 85°C.

#### **4.3.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas quando em ausência de substrato**

Para a avaliação da estabilidade das enzimas frente às variações de pH e temperatura (na ausência de substrato específico), um volume de 0,5 mL de solução enzimática foi misturado à solução tampão 0,05 M com pHs entre 3,0 e 10,0, seguido de incubação por 24 horas a 25°C. A atividade enzimática foi realizada como descrito no item 4.2.1, no pH e temperatura que proporcionaram as maiores atividades.

A termoestabilidade foi avaliada incubando-se a solução enzimática no pH de maior estabilidade em diferentes temperaturas (30-85 °C) por 1 hora. Após a incubação, a atividade enzimática foi determinada nas condições de pH e de temperatura ótimos.

### **4.3.3 Testes de especificidade pelo substrato**

Para testar a especificidade das pectinases, a atividade enzimática foi conduzida como no item 4.2.1, porém nas condições ótimas de pH e temperatura, variando-se os substratos, os quais constaram de pectina de baixa esterificação, pectina altamente esterificada e ácido poligalacturônico, obtidos da Sigma.

## **4.4 Purificação parcial das poligalacturonases**

### **4.4.1 Precipitação de proteínas por saturação com sulfato de amônio**

A precipitação com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ocorreu conforme o protocolo descrito por Scopes (1993): um volume de 40 mL da solução enzimática bruta foi precipitado com frações que variaram de 0-20, 20-40, 40-60, 60-80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , respectivamente, a 4°C e sob agitação, por 4 horas para cada fração. A amostra foi então centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos, também a 4°C.

### **4.4.2 Diálise**

Para o processo de dessalinização, foi utilizada uma membrana de acetato de celulose com 25 mm de diâmetro e corte de 6 a 8 kDa (Sigma-Aldrich), a qual foi adicionada a uma solução composta por bicarbonato de sódio e EDTA e colocada em banho de ebulição por 1 hora. Após a preparação da membrana, a amostra então foi dialisada com dois lotes de água Milli-Q por 1 hora em cada lote, e um lote de tampão acetato-NaOH a 50 mM e pH 5,0 *overnight*.

### **4.4.3 Clarificação**

O material obtido foi filtrado em poros de 10 kDa durante a centrifugação a 4°C e 10.000 xg, e em papel filtro contendo carvão ativado para a clarificação da amostra.

#### 4.4.4 Avaliação das frações de proteína por eletroforese em SDS-PAGE

Foi utilizado para eletroforese gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%, em placa de 10x15 cm, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970).

O gel de separação foi composto por 1,38 mL de água deionizada, 1,67 mL de solução contendo 30% de acrilamida e 0,8% de NN-metileno-bisacrilamida, 1,88 mL de tampão TRIS-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS, 25 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 4 µL de TEMED. A mistura foi vertida na placa e após a polimerização, foi adicionada a mistura para o gel de empilhamento, constituída por 0,76 mL de água deionizada, 160 µL de solução contendo 30% de acrilamida e 0,8% de NN-metileno-bisacrilamida, 49,6 µL de tampão TRIS-HCL 1,5 M, pH 6,8 com 0,4% de SDS, 12,5 µL de solução de persulfato de amônio a 10% e 1 µL de TEMED.

Cada amostra foi prepara utilizando um volume de 50 µL do sobrenadante, tanto da solução enzimática bruta, quanto da solução parcialmente purificada, e então foi adicionado o mesmo volume do tampão de amostra, sendo este composto por 950 µL de tampão Laemmli (Bio-rad) acrescidos de 50 µL de mercaptoetanol. As amostras foram então aquecidas em ebulição por 5 minutos e depois utilizadas na corrida.

Foi utilizado para a corrida tampão TRIS-Glicina 0,25 M, pH 8,3, com 0,1% de SDS. O gel foi submetido a corrente elétrica de 150 V e 30 mA, até o final da corrida (aproximadamente 1 hora e 30 minutos), a 25°C. Após a corrida, o gel foi fixado com uma mistura de 12,0% de ácido acético, 50,0% de metanol e 0,05% de formaldeído por 20 minutos, seguindo-se a coloração com prata, a qual foi feita como descrito a seguir: o gel fixado foi submetido à redução com solução de tiosulfato de sódio a 0,02% por 1 minuto.

Após 3 lavagens com água deionizada, o gel foi mantido em solução de nitrato de prata a 0,2% por 14 minutos. As bandas foram reveladas com solução de carbonato de sódio a 4,0%, contendo 0,05% de formaldeído. A reação com o revelador foi interrompida por adição da solução descorante.

#### **4.4.5 Zimograma**

O zimograma para detecção de bandas com atividade de poligalacturonase na solução enzimática bruta seguiu o protocolo estabelecido por Sassi et al., (2016): a solução enzimática foi misturada com o tampão específico para zimograma (Bio-rad), porém sem aquecimento prévio. O gel foi preparado como no item 4.4.4 e, após a corrida, foi incubado à temperatura ambiente por 2 horas em tampão Tris-HCl 20 mM em pH 8,0 para retirar o SDS. O gel foi incubado sobre uma mistura de 1% de ágar e 1% de ácido poligalacturônico por 1 hora e a 50°C, e posteriormente foi corado com uma solução de vermelho de rutênio a 0,05%, e lavado com água Milli-Q para visualizar a atividade de PG.

### **4.5 Sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar**

#### **4.5.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino**

O pré-tratamento foi realizado em autoclave, segundo metodologia descrita por Zhuang et al. (2009). A palha de cana-de-açúcar previamente lavada, seca e triturada foi levada a autoclave (5% p/v em solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>), em frasco Erlenmeyer e vedada com papel alumínio, a 120°C, durante 1 hora, a 1 atm. Após este período, o frasco foi levado a banho em água gelada e, posteriormente, mantido sob temperatura ambiente para a estabilização. Em seguida, o material foi filtrado em tecido de *nylon* e em filtros de 0,22 µm, sendo a fase líquida analisada quanto à presença de compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocauteu (SINGLETON et al., 1999). A fase sólida foi seca a 40°C, sob circulação de ar, e armazenada a temperatura ambiente para posterior utilização nos experimentos de sacarificação.

#### **4.5.2 Análise das frações da lignocelulose da palha de cana-de-açúcar**

A caracterização da palha foi realizada segundo métodos desenvolvidos pelo NREL (National Renewable Energy Laboratory – EUA) (HAMES et al., 2008; SLUITER et al., 2008). Foram adicionados 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% a uma alíquota de 300 mg da palha, a qual foi mantida em banho-maria a 30°C por 1

hora, com posterior adição de 84 mL de água destilada. As amostras foram então submetidas a autoclave (121°C) por 1 hora para a hidrólise ácida. O sobrenadante foi filtrado em filtros previamente pesados e a fração líquida foi submetida a leitura espectrofotométrica em 240 nm para quantificar a lignina solúvel, enquanto que os teores de glicose e xilose foram quantificados através do cromatógrafo HPAEC-PAD (ICS 5000, *Dionex Corporation* – USA). O material sólido retido no filtro foi lavado com 150 mL de água quente, para retirada de todo ácido remanescente no conjunto amostra/filtro, secos em estufa a 60°C por 24 horas e pesados para obtenção da lignina insolúvel. O material restante foi submetido à mufla à 575°C para obtenção das cinzas ácidas de cada amostra. O experimento foi realizado em duplicata.

#### **4.5.3 Sacarificação enzimática da palha de cana-de-açúcar**

A fim de se testar a eficiência do coquetel, as hidrólises foram realizadas em quatro ensaios distintos:

- I. Utilizando-se apenas a solução enzimática bruta do fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4;
- II. Utilizando-se apenas a solução enzimática parcialmente purificada *Rasamsonia emersonii* BC;
- III. Utilizando-se uma mistura das duas soluções na proporção de 1:1;
- IV. Utilizando-se uma mistura das duas soluções I e II na proporção de 3:1, respectivamente.

A hidrólise foi padronizada com uma concentração de 100 U mL<sup>-1</sup> de CMCase em todos os ensaios, completando o volume reacional de 70 mL com tampão citrato (pH 5,0 e 0,1 M), com 5% de carga de palha de cana-de-açúcar, e a mistura de reação foi incubada a 50°C e 150 rpm por 48 horas. Todos os ensaios foram aplicados tanto para as amostras de palha tratadas quanto não-tratadas, a fim de se averiguar a influência do pré-tratamento.

#### 4.5.4 Análise comparativa de açúcares e álcoois por cromatografia iônica

A quantificação de glicose e xilose foi realizada por meio da cromatografia de troca aniônica, utilizando o HPAEC-PAD (ICS 5000, *Dionex Corporation* – USA) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1 a 25°C e compartimento a 30°C, com diluentes preparados com água deionizada ultrapura 18 MΩ e desgaseificada com N<sub>2</sub>. O fluxo utilizado foi de 1 mL min<sup>-1</sup> com os solventes, A (água ultrapura) e B (500 mM de NaOH), utilizando-se eluição isocrática de 0 a 12 minutos com 4,8% de B, 95,2% de A, de 12 minutos a 16 minutos. Foi realizada uma rampa saindo de 4,8% de B até 100% de A para a limpeza da coluna, e por fim dos 16 minutos aos 30 minutos 4,8% de B e 95,2% de A.

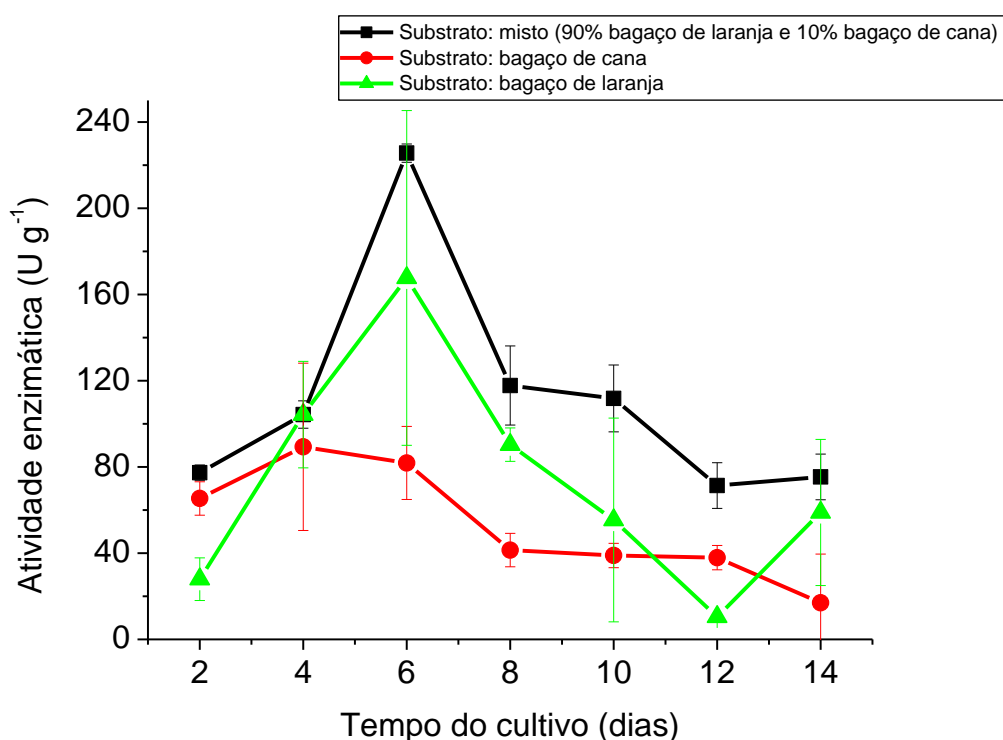


## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação quantitativa inicial da produção de pectinases

O fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC, quando cultivado em meio constituído por mistura de 90% de bagaço de laranja e 10% de bagaço de cana, produziu quantidades significativas de pectinases ( $225,54 \text{ U g}^{-1}$ ), quando em comparação com as enzimas obtidas em cultivos usando os mesmos substratos isoladamente. A atividade máxima encontrada na solução enzimática obtida no cultivo em meio contendo bagaço de cana foi de  $89,32 \text{ U g}^{-1}$ , e de  $167,66 \text{ U g}^{-1}$ , em meio de bagaço de laranja. A produção da enzima por CES foi analisada por um período de 14 dias, sendo que o pico foi observado no sexto dia de cultivo, exceto para a produção de enzimas em bagaço de cana (pico observado no quarto dia de CES). O experimento foi realizado em duplicata, e os valores apresentados no gráfico foram obtidos a partir da média das atividades durante os dois ciclos de cultivo (Figura 13).

**Figura 13.** Atividade de pectinases ( $\text{U g}^{-1}$ ) na solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *Rasamsonia emersonii* BC em estado sólido (CES) em diferentes substratos.



As atividades de pectinases produzidas pelo fungo *R. emersonii* BC em substrato misto foram maiores do que algumas descritas na literatura. O estudo realizado por Martins et al. (2002) relatou a atividade de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* de 32 U g<sup>-1</sup>, quando utilizado como fonte de carbono o bagaço de cana combinado com o bagaço de laranja (9:1 p/p). Silva et al. (2002), ao produzir PGs pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 utilizando como fonte de carbono a mesma mistura e na mesma proporção, obtiveram uma produção máxima de 9 U g<sup>-1</sup>. Silva et al. (2005) obtiveram atividade máxima de uma exo-PG de 71,2 U g<sup>-1</sup>, utilizando também o fungo *P. viridicatum* RFC3, porém tendo como substrato a mistura de farelo de trigo e bagaço de cana (1:1 p/p). O trabalho de Leh et al. (2017) obteve como atividade pectinolítica máxima o valor de 12,7 U g<sup>-1</sup> ao utilizar como substrato casca de laranja e bagaço de cana nas proporções de 70 e 30%, respectivamente, e utilizando o fungo *Aspergillus oryzae*.

Em relação ao tempo de cultivo, os resultados também são compatíveis com alguns descritos na literatura, visto que, no geral, os melhores tempos de cultivo foram entre 4 e 8 dias (96 e 192 horas). O trabalho de Fratebianchi et al. (2017) obteve como ótimo o tempo de 144 horas para as PGs produzidas pelo fungo *Aspergillus sojae*. Ahmed et al. (2016), ao utilizarem a espécie *Aspergillus niger*, obtiveram um ótimo de 120 horas. Silva et al. (2005) obtiveram um tempo ótimo variando entre 96 e 144 horas para uma endo-PG produzida pelo fungo *P. viridicatum* RFC3.

Apesar da comparação dos resultados obtidos com os descritos na literatura ser importante para a avaliação, é importante ressaltar que contrapor níveis de enzimas produzidas por diferentes organismos não é simples, uma vez que foram utilizadas condições de cultura e de dosagem de atividades distintas (MARTINS et al., 2002).

Ao analisar os dados apresentados na Figura 13, é possível inferir que a combinação do bagaço de laranja com o de cana favoreceu a produção das pectinases pois, além da laranja ser rica em pectina e, assim, atuar como indutora de pectinases, o uso do bagaço de cana favorece a aeração e a troca de calor do meio, por formar rede fibrosa que reduz a compactação do substrato (PANDEY et al., 2000; SILVA et al., 2005). O bagaço de cana também atua como fonte de

compostos indutores da expressão das enzimas, por conter celulose (50%), hemicelulose (25%) e lignina (25%) (PANDEY et al., 2000).

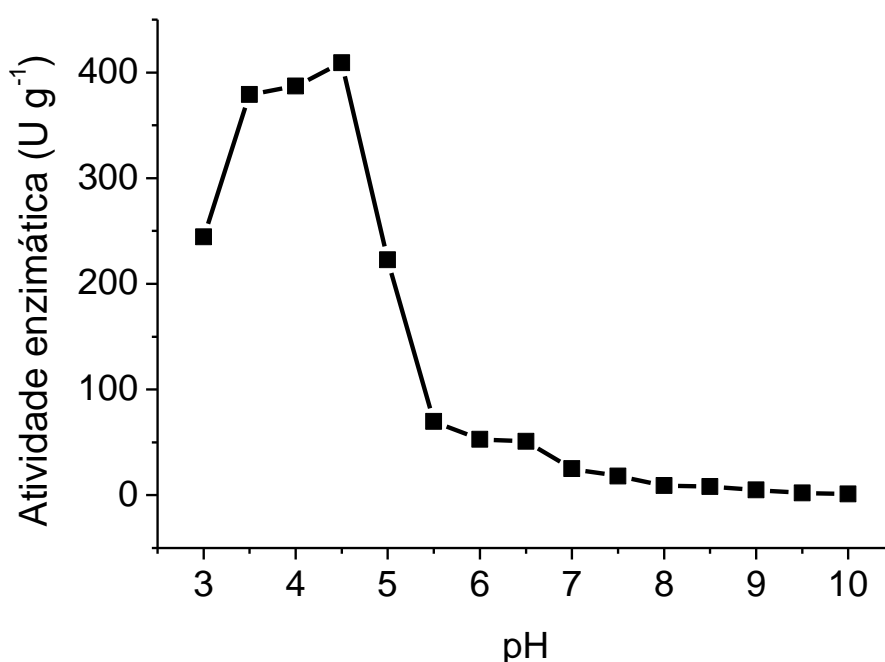
## 5.2 Caracterização físico-química das pectinases

Os resultados apresentados mostram o desempenho das enzimas contidas na solução enzimática bruta, sem qualquer procedimento de purificação. Nessas condições, há possivelmente a influência de componentes do meio de cultivo sobre a atividade e estabilidade das enzimas, considerando a complexidade dos substratos utilizados para comporem o meio de cultivo.

### 5.2.1 Avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade enzimática

Com relação à influência do pH na atividade enzimática frente a diferentes pHs, observa-se uma maior atividade na faixa de pHs entre 3,5 e 4,5, atingindo o pico em pH 4,5, decaindo em cerca de 50% em pH 5,0 e praticamente não tendo atividade em pHs acima de 5,5 (Figura 14).

**Figura 14.** Efeito do pH sobre a atividade de pectinases ( $U\ g^{-1}$ ) da solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *Rasamsonia emersonii* BC em CES.



Com relação à faixa ótima de pH, o resultado obtido é similar aos de literatura. Por exemplo, Saad et al. (2007) obtiveram atividade máxima da PG produzida por *Mucor rouxii* NRRL 1894 em pH 4,5. Amande et al. (2013) obtiveram, ao produzir pectinases a partir da casca de manga pelo fungo *Aspergillus tamarii*, uma faixa ótima de pH variando entre 3,5 e 6,0. O trabalho de Shanmugavel et al. (2018), que também utilizou o microrganismo *A. tamarii* obteve atividade máxima de exo-PG e de pectinesterase (PE) em pH 4,0. Ahmed et al. (2016) ao avaliar a atividade de pectinases produzidas por *A. niger* frente às variações de pH, também observaram uma diminuição das atividades a partir do pH 5,5.

As variações de pH têm a capacidade de alterar o estado iônico das cadeias dos aminoácidos, de forma a alterar a distribuição de cargas e o requerimento de ligações de hidrogênio (VOET et al., 2014). Em condições extremas de pH, pelo menos algumas cargas das proteínas estarão faltando e, conseqüentemente, as interações eletrostáticas estabilizariam a forma funcional nativa da proteína estarão reduzidas, levando à sua desnaturação (CAMPBELL, 2000).

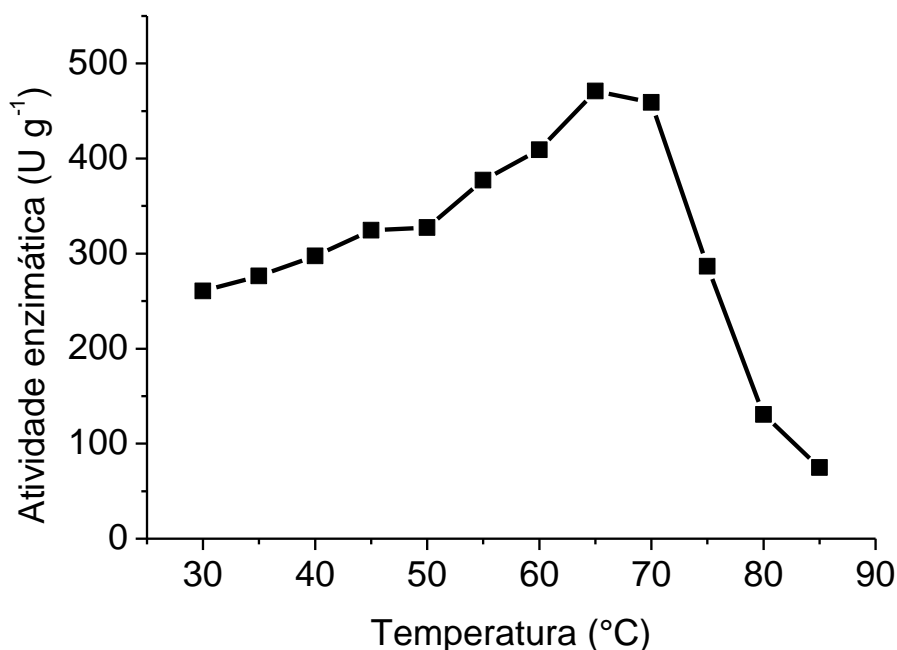
As enzimas hidrolíticas fúngicas geralmente apresentam valores de pH variando entre 3,0 e 7,0, e as curvas de variação das atividades refletem o pH onde grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico estão em seus estados de ionização adequados (SETHURAMAN et al., 1998; NELSON; COX, 2002). Ou seja, atividade das enzimas pode ser regulada, ao menos em parte, por variações do pH do meio em que está inserida (HARPER et al., 1982). Devido à capacidade do pH de influenciar diretamente na desnaturação de proteínas e às variações entre as enzimas de diferentes microrganismos, é importante avaliar sob qual faixa de pH a enzima de interesse atua melhor, visando a otimização dos processos nos quais ela pode ser utilizada.

Os ensaios para avaliação da temperatura ótima foram realizados utilizando-se pH 4,5, visto que foi o pH de maior atividade enzimática.

Como ilustrado na Figura 15, pode-se observar que a enzima apresentou um perfil típico termofílico, com atividade máxima entre 65 e 70°C (471,05 U g<sup>-1</sup> e 459,08 U g<sup>-1</sup>, respectivamente). Apesar da faixa ótima ter sido entre 65 e 70°C,

nota-se que a 75°C a enzima ainda mostra cerca de 50% de sua atividade máxima.

**Figura 15.** Efeito da temperatura sobre a atividade de pectinases ( $\text{U g}^{-1}$ ) da solução enzimática bruta obtida pelo cultivo do fungo *Rasamsonia emersonii* BC em CES.



A 80°C a atividade cai acentuadamente, porém ainda existe considerável atividade, similar ao perfil da endoglucanase desse mesmo fungo (CHIEROTTI, 2016). Rosa (2014) ao caracterizar as enzimas da mesma cepa obteve como temperaturas ótimas de xilanase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase 80, 85 e 70°C, respectivamente.

A termofilia das pectinases em estudo é maior que o descrito por Silva et al. (2007) que obtiveram atividade máxima de pectinases produzidas pelo fungo *P. viridicatum* RFC3 a 60°C. Martial-Didider et al. (2017) obtiveram como temperatura ótima 45 e 50°C para PG e PL isoladas de mamão, respectivamente. Nos trabalhos de Martins et al. (2002), Nighoskar et al. (2006) e Pedrolli et al. (2008), as pectinases apresentaram como ótimo temperaturas entre 60 e 65°C.

Assim como o pH, a temperatura é também um fator imprescindível para que as proteínas estejam na sua forma funcional adequada, visto que, quando expostas a temperaturas altas, vibrações no interior da molécula e a energia

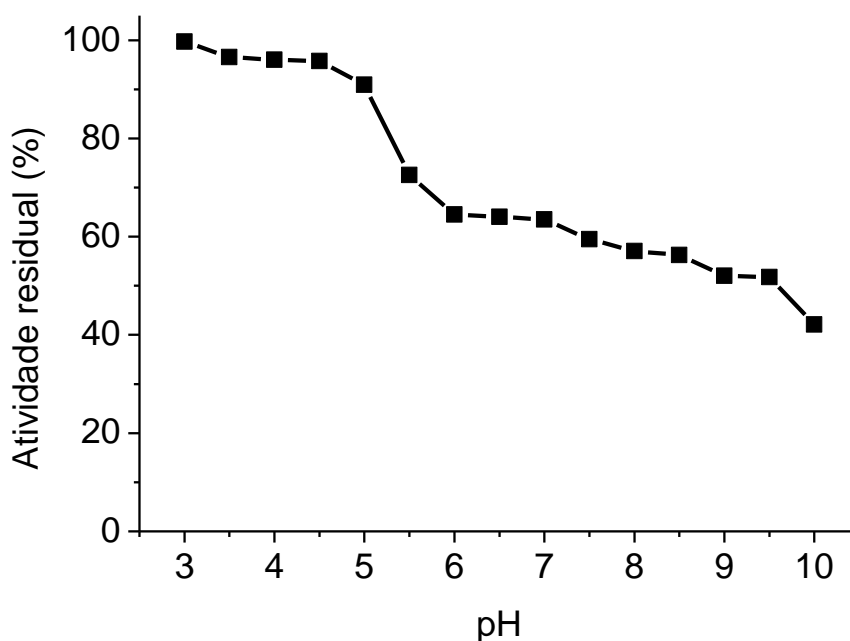
dessas vibrações podem desfazer a sua estrutura terciária e, conseqüentemente, desnaturá-la (CAMPBELL, 2000). Portanto, assim como para o pH, é importante selecionar a temperatura mais adequada para a atividade de uma enzima, principalmente do ponto de vista da sua aplicação.

### 5.2.2 Avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade enzimática em ausência de substrato

Após a determinação do pH e temperatura ótimos, foram feitos testes para determinar a estabilidade das pectinases frente às variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato. A porcentagem de atividade residual foi calculada tomando-se como 100% o valor da atividade enzimática no tempo zero de incubação.

A enzima manteve entre 90 e 100% de sua atividade entre os pHs 3,0 - 5,0, visto que a máxima estabilidade (99,73%) foi observada no pH 3,0. Em pH 5,5 a atividade diminuiu para 72,53% e decresceu continuamente, atingindo 42,13% de atividade a pH 10,0. Os dados estão representados na Figura 16.

**Figura 16.** Efeito do pH sobre a estabilidade (%) de pectinases produzidas pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC em CES. A solução enzimática foi incubada nos diferentes pHs, em ausência de substrato, a 25 °C, por 24 horas.

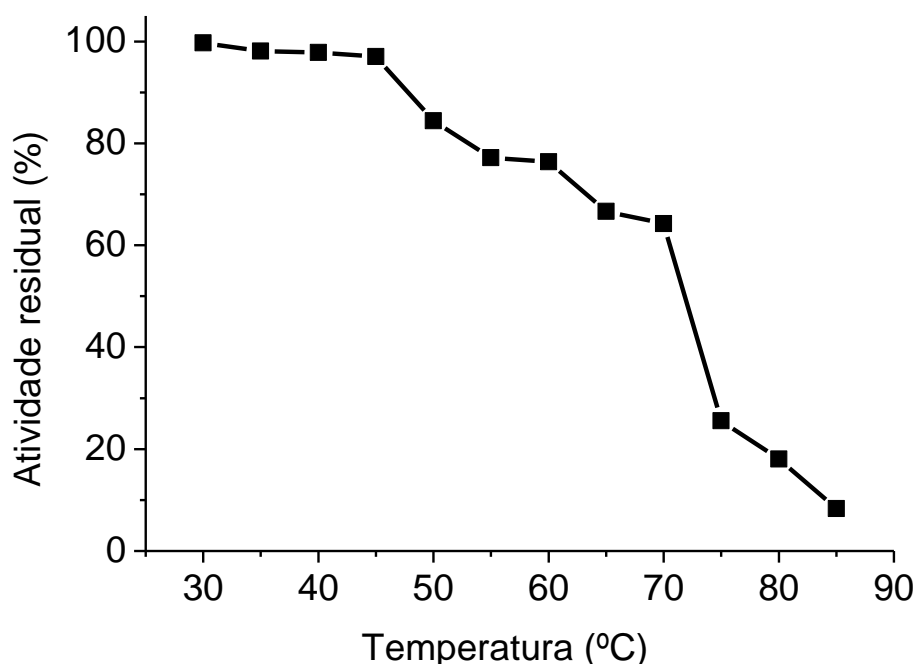


Nota-se que o perfil da enzima em relação à estabilidade em diferentes pHs é similar com os dados publicados de diversos outros trabalhos, indicando o caráter ácido das enzimas. Martial-Didier et al. (2017) obtiveram uma faixa de estabilidade entre 4,5 e 5,5 para as PG isoladas de mamão. Silva et al. (2007) caracterizaram uma PG da cepa *P. viridicatum* RFC3 com estabilidade entre os pHs 3,5 e 4,5.

Os perfis de estabilidade das enzimas em função da temperatura de incubação, em ausência do substrato, foram determinados diluindo-se as alíquotas em tampão de pH 3,0, visto que foi aquele em que as enzimas foram mais estáveis (Figura 16).

Com relação à estabilidade nas diversas temperaturas de incubação, nota-se que a enzima manteve valor próximo a 100% da sua atividade após ser mantida por 1 hora nas temperaturas entre 30 a 45°C. A 50°C a atividade preservada foi 84,40% com relação à atividade original e a 70°C, 60% dessa atividade ainda foi observada. Houve uma queda acentuada a 75°C (75%), e a 85°C sua atividade já era quase nula (8,33%) (Figura 17).

**Figura 17.** Efeito da temperatura sobre a estabilidade (%) de pectinases produzidas pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC em CES. A solução enzimática foi incubada em diversas temperaturas e em ausência de substrato por 1 hora.

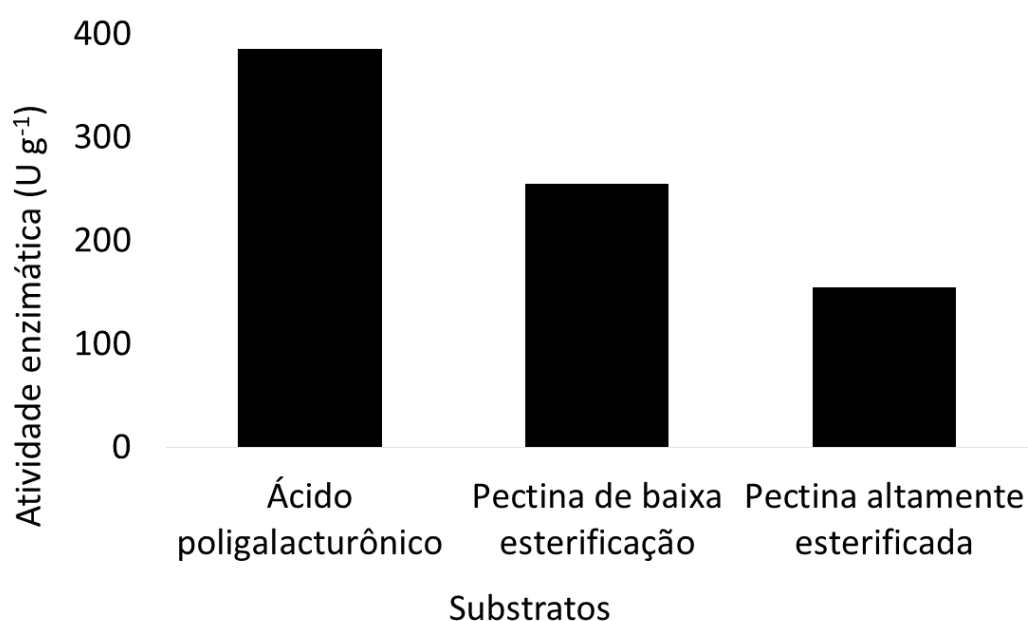


Resultados inferiores foram demonstrados por Silva et al. (2007), que obtiveram apenas 60-75% a 45°C, 18% de atividade a 60°C, e a 80°C a PG produzida por *P. viridicatum* RFC3 foi desnaturada. O trabalho de Martins et al. (2006) apontou resultados similares aos obtidos – a PG obtida por CES pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* manteve 100% de sua atividade até 50°C, sofrendo uma queda brusca a 70 °C e com atividade detectada ainda a 85°C.

### 5.2.3 Análise dos testes de especificidade pelo substrato

Os testes de especificidade pelo substrato foram realizados nas condições de temperatura a 65°C e pH 4,5, condições que proporcionaram maior atividade da pectinase. Os substratos foram escolhidos em função do grau de esterificação: ácido poligalacturônico, pectina de baixa esterificação e pectina altamente esterificada. Nota-se na Figura 18 uma maior atividade sobre o ácido poligalacturônico (385,22 U g<sup>-1</sup>), seguida de pectina de baixa esterificação (254,57 U g<sup>-1</sup>), inferindo-se então que se trata de uma poligalacturonase (JAYANI et al., 2005).

**Figura 18.** Atividade da solução enzimática bruta (U g<sup>-1</sup>) produzida pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC em CES, sobre substâncias pécnicas com diferentes níveis de esterificação.



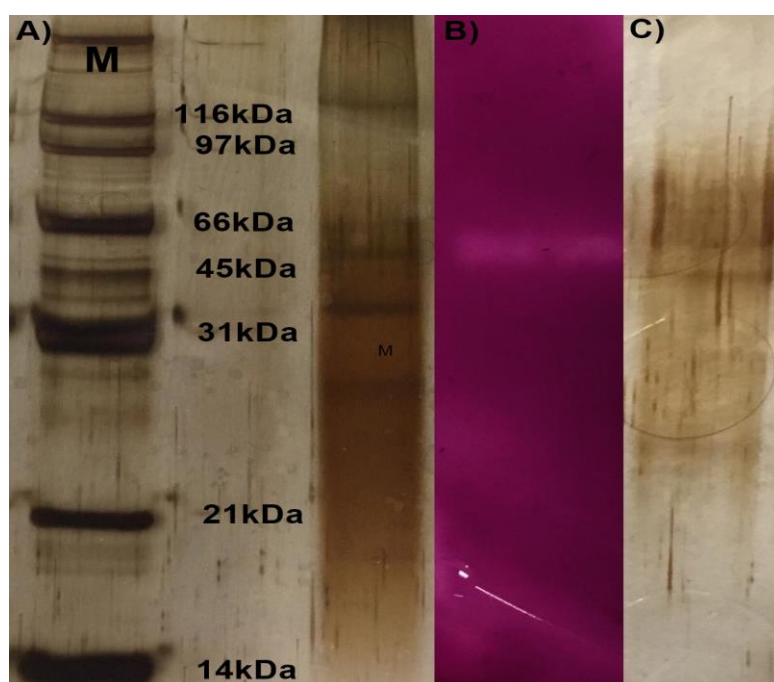


Como foi detectada atividade tendo como substrato a pectina altamente esterificada, pode-se também considerar que outras pectinases, como uma pectinaliase (PL), estejam atuando na mistura reacional. A PL é capaz de despolimerizar pectinas diretamente, quebrando as ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) de pectina de alta esterificação, sem a ação prévia de outras enzimas, mecanismo diferente daquele visto nas PG (ALAFIA et al., 1991; BUSTO et al., 2006).

### 5.3 Purificação parcial

Com a finalidade de diminuir os contaminantes presentes na solução enzimática bruta, foi feita a concentração da enzima por precipitação com saturação com sulfato de amônio, seguido de diálise e filtração. O método do *salting-out* com sulfato de amônio é comumente utilizado na literatura para a purificação de PG (POONDLA et al., 2015; AHMED et al., 2016; MARTIAL-DIDIER et al., 2017; YU; XU, 2017). A Figura 19 representa as bandas em SDS-PAGE em comparação com o zimograma de atividade para poligalacturonase e, ainda, com a eletroforese após os procedimentos de purificação.

**Figura 19.** (A) SDS-PAGE da solução enzimática bruta; (B) Zimograma de atividade de poligalacturonase (PG); (C) SDS-PAGE da PG parcialmente purificada. M: marcador.



A análise de zimograma foi realizada com o objetivo de estimar a massa molar aproximada da enzima. Foi possível observar a atividade de PG pela banda clara entre os marcadores de massa molar entre 45 e 66 kDa, sugerindo massa molar próxima a 60 kDa. As PGs purificadas de diversos fungos apresentam massas moleculares que variam entre 28 até 82 kDa (LANG; DÖRNENBURG, 2000).

Poondla et al. (2015) purificaram parcialmente duas isoformas de uma PG produzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, as quais apresentaram 47 e 50kDa, respectivamente.

A Figura 19 também aponta o perfil proteico da solução enzimática bruta e da suspensão após a precipitação, mostrando que os procedimentos diminuíram o nível de proteínas das amostras.

Ainda a fim de averiguar se o processo de purificação parcial foi eficaz na eliminação de componentes que não fossem poligalacturonases, foi avaliada quantitativamente a produção de xilanases, endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases da solução, de forma a comparar a atividade enzimática da solução bruta e após os procedimentos de purificação, assegurando que, na medida do possível, apenas poligalacturonases fossem adicionadas ao coquetel de hidrólise. Os valores estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Atividade enzimática de pectinases, xilanases, endoglucanases (CMCases) e  $\beta$ -glicosidases ( $U\ g^{-1}$ ) produzidas pelo fungo *Rasamsonia emersonii* BC, quando comparadas as soluções enzimáticas bruta e parcialmente purificada.

	<b>Pectinases</b>	<b>Xilanases</b>	<b>CMCases</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidases</b>
<b>Solução enzimática bruta</b>	225,54	58	224,7	24,8
<b>Suspensão da enzima parcialmente purificada</b>	437,1	12	52,7	6,8

Os dados apresentados indicam que o processo de fracionamento, desenvolvido com foco na pectinase, resultou na concentração dessa enzima. Entretanto, levou à perda das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

#### 5.4 Avaliação da produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4

A cepa do fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 produziu todas as enzimas, destacando-se as xilanases e celulases. Importante ainda é destacar a produção de  $\beta$ -xilosidase, visto que é uma enzima pouco encontrada em meio extracelular (Tabela 3). Esses dados corroboram os de Cassia Pereira et al. (2015).

**Tabela 3.** Atividade de xilanases, endoglucanases (CMCases), pectinases, FPases,  $\beta$ -glicosidases e  $\beta$ -xilosidases produzidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4, em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo (1:1 p/p), a 45°C, em 96 horas.

Enzima	Atividade (U g <sup>-1</sup> )
CMCases	295,8
Xilanases	785,9
Pectinases	12,4
FPases	0,24 (FPU)
$\beta$ -glicosidases	50,8
$\beta$ -xilosidases	4,0

Os dados alcançados, quando comparados com o trabalho de Cassia Pereira et al. (2015), são bem similares, exceto para as  $\beta$ -xilosidases. Os autores obtiveram a atividade máxima de 931,11 U g<sup>-1</sup> de xilanases, 357,51 U g<sup>-1</sup> de endoglucanases, 0,24 FPU de FPases, 45,42 U g<sup>-1</sup> de  $\beta$ -glicosidases e 1,03 U g<sup>-1</sup> de  $\beta$ -xilosidases, porém, não houve referência à atividade de pectinases.

Ang et al. (2013) obtiveram uma produção de 418,7 U g<sup>-1</sup> de xilanases ao trabalharem com o fungo *Aspergillus fumigatus*.

Jecu (2000), ao estudar as endoglucanases produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*, obteve 99,3 U g<sup>-1</sup>, quando cultivado sob CES contendo farelo de trigo e palha de milho como substratos.

As atividades obtidas de FPases (celulases totais) obtidas nesse trabalho foram baixas quando comparadas com os dados de Delabona et al. (2012), os quais obtiveram um máximo de 1,21 FPU. Cabe, entretanto, destacar que a metodologia considerada padrão na dosagem enzimática (GHOSE, 1987) não tem fornecido bons resultados de atividade de FPases, mesmo para microrganismos que são considerados bons produtores das enzimas celulolíticas, como no caso do *M. thermophila* JCP 1-4.

Em relação às  $\beta$ -glicosidases, Dhillon et al. (2011), ao trabalharem com os fungos *A. niger* e *Trichoderma reesei*, obtiveram produções de 21,69 e 13,58 U g<sup>-1</sup> no mesmo substrato.

E, por fim, em relação às  $\beta$ -xilosidases, os resultados diferem em relação a alguns encontrados na literatura científica, como por exemplo o trabalho de Knob e Carmona (2009), o qual foram obtidos 1,47 U g<sup>-1</sup> de enzima em farelo de trigo, porém a atividade não foi detectada tendo bagaço de cana como substrato. É importante ressaltar que, ainda em relação às  $\beta$ -xilosidases, há um predomínio do cultivo submerso para a produção enzimática nos trabalhos publicados, dificultando assim a comparação dos dados.

O farelo de trigo é uma excelente fonte de elementos como carbono e nitrogênio, o qual tem sido amplamente utilizado para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, visto que é composto por proteínas (14%), carboidratos (27%), minerais (5%), gorduras (6%), celulose (7,57%), hemicelulose (31,19%) e, ainda, apresenta baixo teor de lignina (4,06%) (HAQUE et al., 2002; BRIJWANI et al., 2010). Já o bagaço de cana é responsável por favorecer a aeração e a troca de calor do meio, uma vez que forma uma rede fibrosa que reduz a compactação do substrato (PANDEY et al., 2000).

## **5.5 Sacarificação enzimática da palha da cana-de-açúcar**

### **5.5.1 Caracterização da palha *in natura* e pré-tratada por tratamento hidrotérmico alcalino**

Em relação à composição química da biomassa utilizada para a sacarificação enzimática, a palha da cana-de-açúcar, o pré-tratamento promoveu

um aumento da quantidade relativa de celulose de 61,89% (39,3% na palha *in natura* e 63,5% na pré-tratada), e um 60,87% de quantidade relativa de hemicelulose (14% na palha *in natura* e 23% na pré-tratada). Quanto ao processo de deslignificação, houve uma taxa de 41,67% de redução do teor de ligninas totais (24% na palha *in natura* e 10% na palha pré-tratada). Os dados obtidos estão resumidos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Análise de composição química (%) para amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* e tratadas com pré-tratamento hidrotérmico alcalino.

	Palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i> (%)	Palha de cana-de-açúcar pré-tratada (%)
<b>Celulose</b>	39.3±1.3	63.5±0.15
<b>Hemicelulose</b>	14.0±0.9	23.0±0.2
<b>Lignina</b>	24.0±2.0	10.0±0.55
<b>Extrativos</b>	12.5±1.5	-
<b>Cinzas</b>	5.5±1.1	4.5±0.75

De maneira geral, os ganhos relativos de celulose e a redução da lignina demonstraram que a combinação de processos foi efetiva. Tais características da palha pré-tratada, como o alto teor de celulose e baixo teor de lignina, demonstram alta compatibilidade química com as características imprescindíveis ao processo de hidrólise. A combinação dos processos de pré-tratamento hidrotérmico acrescido de NaOH é importante, pois o primeiro não é suficiente para a deslignificação devido à barreira física contra a ação enzimática decorrente de sua estrutura (ROCHA et al., 2012). A extração alcalina contribui para uma hidrólise enzimática mais rápida e com um maior rendimento em açúcares, atuando na separação das ligações estruturais entre a lignina e os demais carboidratos, assim como na estrutura da própria lignina (KARP et al., 2013).

Guilherme et al. (2019), ao utilizarem a mesma combinação de pré-tratamentos no bagaço de cana-de-açúcar, obtiveram um aumento relativo de 62,1% do teor de celulose, uma redução de 41,3% do teor de hemicelulose e uma redução de 44,2% do teor de lignina. No que diz respeito às frações de celulose e lignina, os dados obtidos no presente trabalho são bem similares aos publicados

pelos autores (61,89 e 41,67%, respectivamente). Porém, é importante ressaltar que substratos e metodologias diferentes resultam em uma ampla gama de resultados e, no caso dos dados publicados na literatura, além do pré-tratamento hidrotérmico ter sido realizado isoladamente e em reator, a temperatura e a pressão utilizadas foram diferentes das utilizadas no presente trabalho (GUILHERME et al., 2015).

#### **5.5.1.1 Solubilização de compostos fenólicos totais (CFT)**

Os processos de degradação e solubilização da lignina presente na biomassa, promovidos pela adição de NaOH ao pré-tratamento hidrotérmico, resultam na geração de fragmentos residuários, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos de baixa massa molecular (JÖNSSON; MARTÍN, 2015).

O pré-tratamento hidrotérmico combinado com o alcalino liberou uma concentração de 2496,6 mg L<sup>-1</sup> de compostos fenólicos totais no líquido obtido (49,93 mg g<sup>-1</sup> de palha pré-tratada), demonstrando uma intensa deslignificação.

Bordignon Júnior (2017) obteve uma concentração de 2320 e 3000 mg L<sup>-1</sup> de CFT a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo processo hidrotérmico e pelo processo combinado com ozonólise, respectivamente. Perrone (2015), ao testar diferentes combinações de processos para a remoção da lignina, obteve uma concentração de 6,7 mg g<sup>-1</sup> de bagaço pré-tratado por ozonólise seguida de lavagem alcalina.

Apesar de tais compostos serem indesejáveis por sua ação inibidora de enzimas, durante o processo hidrotérmico estes são separados da fração sólida (palha) por filtração e, conseqüentemente, a maior parte dos compostos são carregados pelo líquido. Assim, obtém-se um substrato pré-tratado com uma menor quantidade de fenólicos para a posterior sacarificação.

#### **5.5.2 Análise comparativa de glicose por cromatografia iônica (HPAEC-PAD)**

Os resultados obtidos na sacarificação estão mostrados na Tabela 5. Nota-se um maior rendimento alcançado pela combinação das soluções enzimáticas dos fungos *M. thermophila* e *R. emersonii*, na proporção de 3:1 e utilizando a

palha pré-tratada (73,15 mg g<sup>-1</sup> de palha ou 11,4% de rendimento), seguido do coquetel de proporção de 1:1 (59,75 mg g<sup>-1</sup> de palha ou 9,37% de rendimento). Os dados apresentados na tabela apontam, além da eficácia da adição de pectinases, a importância da deslignificação promovida pelo pré-tratamento, demonstrando resultados positivos obtidos pelo processo.

**Tabela 5.** Liberação de glicose durante a sacarificação enzimática da palha da cana-de-açúcar *in natura* e após tratamento hidrotérmico alcalino. Foram utilizadas as soluções produzidas pelos fungos *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 e *Rasamsonia emersonii* BC isoladamente, assim como nas proporções de 1:1 e 3:1, respectivamente. PC = palha de cana-de-açúcar.

Solução enzimática	Amostra PC	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	Glicose (mg g <sup>-1</sup> PC)	Glicose (mg g <sup>-1</sup> celulose)	Rendimento (%)
<i>M. thermophila</i>	<i>In natura</i>	1,3	26,1	40,9	4
	Pré-tratada	2,9	58,0	91,0	9,1
<i>R. emersonii</i>	<i>In natura</i>	0,3	6,1	9,51	0,9
	Pré-tratada	0,6	11,72	18,4	1,8
Coquetel 1:1	<i>In natura</i>	0,71	14,3	22,5	2,3
	Pré-tratada	3,0	59,8	93,7	9,4
Coquetel 3:1	<i>In natura</i>	1,5	29,8	46,7	4,6
	Pré-tratada	3,7	73,2	114,8	11,4

Em todos os tratamentos, a concentração de endoglucanases (CMCases) foi de 100 U (unidades totais), o que determinou o volume de solução enzimática utilizado. A fim de testar o efeito da adição das pectinases, foram testadas as atividades no volume utilizado, e os dados obtidos foram de 6,5 U na solução enzimática do *M. thermophila* JCP 1-4, 1532 U na solução enzimática do *R. emersonii* BC, 54,4 U no coquetel de proporção de 1:1 e 42,29 U no coquetel de proporção de 3:1.

Os dados demonstram que a adição da poligalacturonase ao coquetel obtido pelo cultivo de um fungo tipicamente celulolítico, na proporção 3:1 foi o

tratamento mais eficiente, indicando que a presença das pectinases afeta positivamente a sacarificação quando em presença de maiores quantidades de celulases e hemicelulases, confirmando sua função de enzima acessória.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito positivo da adição de enzimas acessórias como as pectinases em sistemas celulolíticos. Delabona et al. (2013) testaram a sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, suplementando as celulases do fungo *Trichoderma harzium* P49P11 com pectinases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, e obtiveram resultados positivos quanto à adição das duas enzimas acessórias, apesar de testarem métodos de hidrólise e quantificação de açúcares diferentes. Maitan-Alfenas et al. (2015), visando avaliar a influência de métodos de pré-tratamento na sacarificação do bagaço a partir da comparação entre o perfil enzimático do fungo *Chrysosporthe cubensis* e de um coquetel enzimático comercial, também obtiveram resultados positivos em relação à adição das pectinases.

As pectinases, apesar de não atuarem na degradação da celulose em si, favorecem a hidrólise da biomassa e contribuem para uma melhor ação do coquetel enzimático, visto que elas atuam na remoção da pectina, uma barreira para o acesso das celulases, sendo assim fundamentais dentro do efeito sinérgico (BERLIN et al., 2007; DELABONA et al., 2013).

Os resultados obtidos apontam também um maior rendimento na sacarificação da palha pré-tratada. O processo de sacarificação da biomassa depende, além da carga enzimática utilizada e da composição do coquetel, do método de pré-tratamento empregado, o qual tem por objetivo a desestruturação do arranjo cristalino da celulose e da proteção conferida pela hemicelulose e pela lignina, facilitando o acesso das enzimas às ligações glicosídicas dos carboidratos (CARRASCO et al., 2010; MAITAN-ALFENAS et al., 2015).



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho permitem concluir que:

- O fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC foi capaz de produzir pectinases com elevada termofilia e termoestabilidade, quando cultivado em substrato sólido composto por bagaço de laranja e bagaço de cana;

- A pectinase produzida demonstrou ser uma poligalacturonase, com maior atividade em pH 4,5 e a 65-70°C e massa molar estimada em 60 kDa;

- O fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 produziu quantidades significativas de CMCase,  $\beta$ -glicosidases, xilanases e  $\beta$ -xilosidases quando cultivado em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo;

- Quando adicionada à solução enzimática bruta obtida por cultivo de *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4, a pectinase promoveu um aumento significativo do rendimento em glicose na sacarificação de palha de cana previamente submetida a tratamento hidrotérmico alcalino.

## REFERÊNCIAS

ABIPTI, Associação Brasileira das Instituições de Pesquisa Tecnológica. Manual dos Derivados da Cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: **ABIPTI**, p. 474, 1999.

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, p. 148-154, 2016.

ALAFIA, A.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. **The Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 280, p. 335-340, 1991.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; et al. Industrial applications of pectic enzymes – a review. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p.21-28, 1998.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F. Screening de *Mucor* spp para produção de amilase, lipase, poligalacturonase e protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 325 - 330, 2002.

AMANDE, T.; ADEBAYO-TAYO, B.; NDUBUISI-NNAJI, U.; et al. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamaritii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food science**, v. 3 (1), p. 59-62, 2013.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018.

ANG, S. K., SHAZA, E. M., et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, p. 1-10, 2013.

ANKE, H.; WEBER, R. W. S. White rots, chlorine and the environment – a tale of many twist. **Mycologist**, v. 20, p. 83-89, 2006.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Review**, v. 29, p. 719–739, 2005.

ATALLA, R. H.; HACKNEY J. M.; UHLIN, I. Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native celuloase. **International Journal Biological Macromolecules** v. 15, p.109, 1993.

BAJPAI, P. Deinking with Enzymes Recycling and Deinking of Recovered Paper. **Elsevier Insights**, p.139-153, 2014.

BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 287-296, 2007.

BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. Microbial pectinases and their applications in industries: A review. **International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)**, v. 4, p. 829-836, 2017.

BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X. P.; et al. Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 88 (2), p. 638-645, 2012.

BONNIN, E.; LE GOFF, A.; van ALEBEEK, G. J. W. M., et al. Mode of action of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonases towards acetylated pectin. **Carbohydrate Polymers**, v.52, p. 381–388, 2003.

BORDIGNON JÚNIOR, S. E. Bioprocesso de produção de etanol celulósico por tratamento ácido-hidrotérmico mediado por ozônio. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP, 2017.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v. 255, p. 445-450, 1988.

BOUSSARSAR, H.; ROGE, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6537–6542, 2009.

BRANDT, A.; GRÄSVIK, J.; HALLETT, J. P.; et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15 (3), p. 550-583, 2013.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P.V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**, v. 2010, p.1-10, 2010.

BROWN, M. E.; CHANG, M. C. Exploring bacterial lignin degradation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 1-7, 2014.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; da COSTA, A. C. Improvement of sugarcane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, 187, p.173-181, 2015.

BUSTO, M. D.; GARCÍA-TRAMONTÍN, K. E.; ORTEGA, N.; et al. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1477-1483, 2006.

CAFFAL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**. 344. 1879-1900, 2009.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira et al., 3 ed., Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através da pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.

CANTERI, H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; et al. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149-157, 2012.

CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.; SENDELIUS, J.; et al. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 64–73, 2010.

CARRIER, M., LOPPINET-SERANI, A., DENUX, D., et al. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. **Biomass Bioenergy**, v. 35 (1), p. 298–307, 2011.

CASSIA PEREIRA, J.; PAGANINI MARQUES, N.; RODRIGUES, A.; et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928–939, 2015.

CASTILHO, L. R.; TITO, R. A. M.; ALVES, L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid-state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45–50, 2000.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHEN, B.; WU, Q.; XU, Y. International Journal of Food Microbiology Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai - flavor liquor. **International Journal of Food Microbiology**, v. 179, p. 80–84, 2014.

CHEN, W. H.; PEN, B. L.; YU, C. T.; et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2916–2924, 2011.

CHIEROTTI, M. C. M. Caracterização de uma endoglucanase termoestável do fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* BC. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP, 2016.

CODNER, R.C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology**, 84, p. 147–160, 2001.

COMBO, A. M. M.; AGUEDO, M.; Goffin, D. Enzymatic production of pecticoligosachharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. **Food and Bioproducts Process**, v. 90, p.588–596, 2012.

COONEY, D. G.; EMERSON, R. Thermophilic Fungi. 1st ed. W. H. **Freeman and Company**, San Francisco, 1964.

COSGROVE, D. J. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 171–201, 1997.

COUGHLANM, P.; LJUNGDAHLL, G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. In **Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, FEMS Symposium**, n. 43, p. 11-30, 1988.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; da SILVA, M. R. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

DELABONA, P. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; et al. Understanding the cellulosic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500-507, 2013.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 6–13, 2011.

DOCOS, T.; WILLIAMS, P.; VIDAL, S. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the cell walls of growing plant cells form a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. In vitro conditions for the formation of dimer. **Carbohydrate Research** v. 297, p. 181. 1997.

ELLEUCHE, S.; SCHÄFERS, C.; BLANK, S.; et al. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. **Current opinion in Microbiology**, v. 15, p. 113-119, 2015.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; ALMEIDA, M. N. D.; et al. *Chrysosporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296–305, 2013.

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44 (2), p. 221-227, 2006.

FELIPE, M. G. A.; CORTEZ, L. A. B. Em Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para Produtividade Sustentabilidade. **Edgard Blücher Ltda**: São Paulo, 2010, cap. 3, parte 4, 2010.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. **Berlin: Walter de Gruyter**, p. 613, 1989.

FRATEBIANCHI, D.; CRESPO, J. M.; TARI, C.; et al. Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 305-310, 2017.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, p. 257—268, 1987.

GIACOBBE, S.; PEPE, S.; VENTORINO, V.; et al. Identification and characterization of a pectinolytic enzyme from *Paenibacillus xylanolyticus*. **BioResources**, v. 9, p. 4873–4887, 2014.

GILEAD, S.; SHOHAM, Y. Purification and characterization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, p. 170-174, 1995.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–800, 2010.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; et al. Enzimas termoestáveis: fonte, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30 n. 1, 2007.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SANTOS, E. S.; et al. Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, p. 23–33, 2015.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F. PADILHA, C. E. A.; et al. Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. **Journal of Environmental Management**, v. 234, p. 44-51, 2019.

GUO, H.; CHANG, Y.; LEE, D. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 198-215, 2018.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HAMES, B. et al. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP). Issue Date: 8/06/2008. Preparation of Samples for Compositional Analysis Laboratory Analytical Procedure (LAP), 2008.

HAQUE, M. A.; SHAMS-UD-DIN, M.; HAQUE, A. The effect of aqueous extracted wheat bran on the baking quality of biscuit. **International Journal of Food Science Technology**, v.37, p. 453 – 462, 2002.

HARPER, H.A., RODWELL, V.W.; et al. Manual de Química Fisiológica, 5 ed., p. 736, 1982.

HASSAN, N.; RAFIQ, M.; REHMAN, M.; et al. Fungi in acidic fire: A potential source of industrially important enzymes. **British Mycological Journal**, 2018.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105 (12), p. 1422 – 1432, 2001.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal arylalcohol oxidase: A peroxide-producing flavoenzyme involved in lignina degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1395–1410, 2012.

HORN, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biothechnology for Biofuels**, v.5, p. 1-13, 2012.

HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1–14, 2011.

INAMDAR, A. Polygalacturonase from *Thermoascus auranticus*: isolation and functional characteristics. **Indian Institute of Science**, 1987.

IBRAHIM, H. S. Pretreatment of straw for bioethanol production. **Energy Procedia**, v. 14, p. 542-551, 2012.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v.6, p. 4497-4559, 2015.

JACOB, N. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization, Part IV: Enzymes Degrading Agroindustrial Residues and Their Production. **Springer**, c. 21, p. 383-396, 2009.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40 (9), p. 2931 - 2944, 2005.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1 -5, 2000.

JEFFRIES, T.W. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. **Biodegradation**, v. 1, p. 163-176. 1990.

JONOBI, M.; OLADI, R.; DAVOUDPOUR, Y.; et al. Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review. **Springer Science + Business Media**, v. 22, p. 935-969, 2015.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, 2015.

KAN, X.; YAO, Z.; ZHANG, J.; et al. Energy performance of an integrated bio-and-thermal hybrid system for lignocellulosic biomass waste treatment. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 77–88, 2017.

KARP, S. G.; WOICIECHOWSKII, A. L.; SOCCOL, V. T.; et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: A review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 679–689, 2013.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technology**, v. 94, p. 239–243, 2004.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. Cell-associated acid  $\beta$ -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. **New Biotechnology**, v.9, n. 1/2, p. 60-67, 2009.



KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p.279-285, 2015.

KOLENOVA, K.; VRANSKA, M.; *et al.* Mode of action of endo- $\beta$ -1,4-xylanases families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 338-345, 2006.

KONDO, T. The relationship between intramolecular hydrogen bonds and certain physical properties of regioselectively substituted cellulose derivatives. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, 35, 717, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LEH, D. S.; BIZ, A.; RICHARD, P.; *et al.* Conversion of citric pectin into D-galacturonic acid with high substrate loading using a fermented solid with pectinolytic activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 214-219, 2017.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; *et al.* Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LI, Z.; BAI, Z.; ZHANG, B.; *et al.* Purification and characterization of alkaline pectinase from a newly isolated *Bacillus clausii* and its application in elicitation of plant disease resistance. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 2241–2256, 2012.

LI, C.; WANG, L.; CHEN, Z.; *et al.* Ozonolysis pretreatment of maize stover: the interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. **Bioresource Technology**, 183, p. 240-247, 2015.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449–467, 2012.

LINGXIA, S.; STEVEN, N. Analysis of promoter activity of members of the pectate lyase like (PLL) gene family in cell separation in Arabidopsis. **Plant Biology**, 10, p. 152, 2010.

MADADI, M.; TU, Y.; ABBAS, A. Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Recent Status on Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. **Electronic Journal of Biology**, v. 13, n. April, p. 135–143, 2017.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms, **Prentice Hall International Inc.**, New York, 10<sup>a</sup> ed., 2003.

MAEDA, R.N., BARCELOS, C.A., ANNA, L.M.M.S. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 38–44, 2013.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology**, v.192, p. 670-676, 2015.

MARTIAL-DIDIER, A. K.; HUBERT, K. K.; PARFAIT, K. E. J.; et al. Partial purification and Characterization of Two Pectinases (Polygalacturonase and Pectin lyase) from Papaya Pericarp (*Carica papaya* cv. solo 8). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6 (6), p. 2729-2739, 2017.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E; et al. Solid-state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A. M. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99 (7), p. 2939-2954, 2015.

MORI, T.; TSUBOI, Y.; ISHIDA, N.; et al. Multidimensional highresolution magic angle spinning and solution-state NMR characterization of <sup>13</sup>C-labeled plant metabolites and lignocellulose, **Scientific Reports**. 5, p. 1–12, 2015.

MORIYA, R. Y.; GONÇALVES, A. R.; DUARTE, M. C. T. Ethanol/water pulps from sugarcane straw and their biobleaching with xylanase from *Bacillus pumillus*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 137-140, 501-513, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIGHOSKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D.; et al. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1136-1140, 2006.

OSLEN, H.S. Enzymes at work- A concise guide to industrial enzymes and their use. **Novozymes A/S Bagsvaerd**, Denmark, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PEDROLI, D. B; GOMES, E.; MONTI, R.; et al. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Appl Biochem Biotechnol**:191-200, 2008.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37 (6), p. 567–573, 2010.

PERRONE, O. M. Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP, 2015.

POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM, R.; et al. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 70-76, 2015.

PHITSUWAN, P.; LAOHAKUNJIT N.; KERDCHOECHUEN, O.; et al. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. **Folia Microbiologica**, v. 58, p. 163–176, 2013.

PHUTELA, U. DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36: 63-69, 2005.

PILNIK, W.; ROMBOUTS, F.M. Pectic enzymes. **Enzymes and food processing**. London: Applied Science Publishers, p. 105-128, 1981.

POLETTI, M.; ORNAGHI JUNIOR, H. Cellulose – Fundamental aspects and current trends. **InTech**, c. 10, p. 251-273, 2015.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATTI, A.C.S.; et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67 (5), p. 577–591, 2005.

POWELL, I. B.; et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 87–97, 2012.

RASMUSSEM, L.E.; SORENSEN, H.R.; et al. mode of action and properties of the xylanase from *Talaromyces emersonni* and *Trichoderma reesei*. **Biotechnology Bioenergy**, v. 94, p. 869–876, 2006.

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 115–123, 2000.

ROBL, D.; COSTA, P. S.; BÜCHLI, F.; et al. Enhancing of sugar cane bagasse hydrolysis by Annulohporon stygium glycohydrolases. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 247-254, 2015.

ROCHA, G. J. M.; MARTÍN, C.; SILVA, V. F. N.; et al. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447–452, 2012.

RODRIGUES, A.; Da SILVA, G.; ORTEGA, C.E.T.; et al. Techno-economic analysis of different pretreatment processes for lignocellulosic-based bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 561–570, 2016.

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 54-63, 2008.

ROSA, I. Z. Isolamento e seleção de fungos termofílico produtores de celulasas, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP, 2014.

SAAD, N.; BRIAND, M.; GARDARIN, C.; et al. Production, purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Mucor rouxii* NRRL 1894. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p. 800-805, 2007.

SABAJANES, M. M.; YANEZ, R.; ALONSO, J. L.; et al. Pecticoligosaccharides production from orange peel waste by enzymatic hydrolysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 747–754, 2012.

SAKAI, T. Degradation of pectins. In: Microbial degradation of natural products, **G. Winkelmann, (Ed.)**, p. 57-81, VCH, ISBN: 3527283544, Weinheim & New York, Germany & US, 1992.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SALIBA, E. O.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A.; et al. Ligninas – métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SANDRI, I.G.; LORENZONI, C.M.T.; FONTANA, R.C.; et al. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. **LWT - Food Sci. Technol.** v. 51, p. 469-475, 2013.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de bioetanol. **Química Nova**, v. 35, nº5, p.1004-1010, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, nº1, p. 56-62, 2014.

SARASWAT, V.; BISARIA, V. S. Biosynthesis of xylanolytic and xylan-debranching enzymes in *Melanocarpus albomyces* IIS 68. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 352–357, 1997.

SARKAR, N.; GOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable energy**, v. 39 (1), p. 19-27, 2012.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 643 - 646, 1999.

SASSI, H. A.; TOUNSI, H.; TRIGUI-LAHIANI, H.; et al. A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*: characterization and application in juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 158-164, 2016.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010.

SCOPES, R. K. Protein Purification: Principles and Practice. **Springer-Verlag**, New York, 3<sup>a</sup> ed, 1993.

SERRA, J. L.; ALKORTA, I.; LLAMA, M. J.; et al. Aplicacion industrial de los enzimas pécicos. Produccion, purificacion, inmovilizacion y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, v. 11, p. 127-134, 1992.

SETHURAMAN, A.; AKIN, D.E.; et al. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 27, p. 37-47, 1998.

SHANMUGAVEL, M.; VASANTHARAJ, S.; YAZHMOZHI, A.; et al. A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopygments processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 295-303, 2018.

SILVA, V. F. N.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A.; et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 809–817, 2011.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; GOMES, E.; et al. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; LEITE, R. S. R.; et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1237-1243, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152-178, 1999.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP). **NREL**, Golden, Co., USA, 2008.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

STELTE, W.; HOLM, J. K.; SANADI, A. R.; et al. A study of bonding and failure mechanisms in fuel pellets from diferente biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 35 (2), p. 910-918, 2011.

SUHARDI, V.S.H.; PRASAI, B.; SAMAHA, D.; et al. Combined biological and chemical pretreatment method for lignocellulosic ethanol production from energy cane. **Renewable Bioresource**, v. 1, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SWEENEY, M. D.; XU, F. Biomass Converting Enzymes as Industrial Biocatalysts for Fuels and Chemicals: Recent Developments. **Catalysts**, v. 2, n. 2, p. 244–263, 2012.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: enzymes for fruit processing industry. **International Food Research Journal** 21 (2): 447-453, 2014.

TARIQ, A.; LATIF, Z. Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6 (45), p. 7259-7264, 2012.

TÉBÉKA, I.R.M., SILVA, A.G.L., PETRI, D.F.S. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. **Langmuir**, v. 25, p. 1582–1587, 2009.

UENOJO, M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p. 388-394, 2007.

US DOE, 2007. Biofuels Primer Placemat: From Biomass to Cellulosic Ethanol and Understanding Biomass: Plant Cell Walls, **US Department of Energy Office of Science**. Disponível em: <<https://public.ornl.gov/site/gallery/gallery.cfm>>. Acesso em: 12/06/2018.

VAN DYK, J.S.; PLETSCHKE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, p.1458–1480, 2012.

VÁRNAI, A.; HUIKKO, L.; PERE, J.; et al. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9096–9104, 2011.

VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G. Purification strategies from microbial pectinases. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 11 (2), p.144-59, 2017.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: from science to industry. **Biomass Bioenergy**, v. 46, p. 13–24, 2012.

VILLAREAL, M. R. Diagrama da parede celular das plantas. Khan Academy, 2007. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant\\_cell\\_wall\\_diagram-en.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plant_cell_wall_diagram-en.svg)>. Acesso em: 06/07/2018.

VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, J. R.; et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I: Implications for cell wall architecture. **Plant Physiologic**, v.132, p. 1781-1789, 2003.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de bioquímica – A vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

VOLYNETS, B.; EIN-MOZAFFARI, F.; DAHMAN, Y. Biomass processing into ethanol: pretreatment, enzymatic hydrolysis, fermentation, rheology, and mixing. **Green Processing and Synthesis**, v. 6, p. 1–22, 2017.

VOUTILAINEN, S. P.; BOER, H.; LINDER, M. B.; et al. Heterologous expression of *Melanocarpus albomyces* cellobiohydrolase Cel7B, and random mutagenesis to improve its thermostability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 234–243, 2007.

VOUTILAINEN, S. Fungal thermostable cellobiohydrolases: Characterization and protein engineering studies. **VTT Publications**, v. 754, p. 14-30, 2010.

WANDERLEY, M. C. D. A.; MARTÍN, C.; ROCHA, C.; et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.128, p. 448-453, 2013.

WHITAKER, J. R. Microbial pectinolytic enzymes. *Microbial enzymes and biotechnology* (2nd edition), W.M. Fogarty & C.T. Kelly, (Eds.), p. 133-176, **Elsevier Science Ltd.**, ISBN: 1851664866, London, England, 1990.

WILLATS, W.G.T.; KNOX, P., MIKKELSEN, J.D. Pectin: new insights into na old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology** (l). 17, p.97–104, 2006.

WOODWARD, J. Synergism in cellulase systems. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 67–75, 1991.

XIA, J.; LI, P. Pectic enzymes. **Elsevier Inc**, 2018.



XIAO, K.; YUAN, Y.; XIAO, N.; et al. Enzymatic saccharification responses of *Eichhornia crassipes*, sugarcane bagasse and *Metasequoia glyptostroboides* to two oxidation pretreatments for biofuel production. **Industrial Crops & Products**, v. 107, p. 22-29, 2017.

YADAV, S., YADAV, P.K., YADAV, D.; et al. Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* suitable for retting of natural fibers. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 159, p.270–283, 2009.

YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; et al. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 1–55, 2010.

YU, P.; XU, C. Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus sp.* ZJ1407. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 972-980, 2017.

ZHOU, M.; WU, J.; WANG, T.; et al. The purification and characterization of a novel alkali-stable pectate lyase produced by *Bacillus subtilis* PB1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 190, 2017.

ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 578–582, 2009.